

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO DE OLIVEIRA CORRÊA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus subspicatus* PARA
OBTENÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE
VEGETAL

CURITIBA

2019

DIEGO DE OLIVEIRA CORRÊA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus subspicatus* PARA
OBTENÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE
VEGETAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Rabello Duarte

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Corrêa, Diego de Oliveira

Produção de biomassa microalgal de *Desmodesmus subspicatus* para obtenção de compostos com potencial atividade bioestimulante vegetal. / Diego de Oliveira Corrêa. – Curitiba, 2019.
156 p.: il.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá

Coorientadora: Maria Eugênia Rabello Duarte

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

1. Fotobioreatores 2. Floculação 3. Microalgas 4. Hormônios vegetais
I. Título II. Nosedá, Miguel Daniel III. Duarte, Maria Eugênia Rabello IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

CDD (20. ed.) 576.162



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DIEGO DE OLIVEIRA CORREA** intitulada: **PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus subspicatus* PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Maio de 2019.

MIGUEL DANIEL NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora

MARCIEL JOAO STADNIK
Avaliador Externo (UFSC)

KATIA CHRISTINA ZUFFELLATO-RIBAS
Avaliador Externo (UFPR)

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI
Avaliador Interno (UFPR)

JULIO CESAR DE CARVALHO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho aos meus sobrinhos José, Sara e Mariana
Que lhes possa servir de inspiração para buscarem suas conquistas ao longo de
suas vidas

AGRADECIMENTOS

Em certas circunstâncias o ato de agradecer, ainda que justo, pode ser um tanto problemático, especialmente quando a pessoa que é grata sofre de uma espécie de Alzheimer precoce que frequentemente resulta em episódios de “O que eu estava fazendo mesmo?”, correndo assim o risco de parecer ingrato para com os colegas e amigos. Mesmo assim, é justo render os devidos agradecimentos àqueles que de qualquer maneira contribuíram para realização de todas as etapas que resultaram, em última instância, na redação dessas palavras.

Primeiramente sou grato aos meus familiares e amigos mais próximos, pelo amor e carinho constantes ao longo de toda minha vida.

À minha mãe, por sempre fazer o possível para proporcionar o melhor aos seus filhos, mesmo nos momentos mais difíceis ou quando algum de nós não merecia tamanha dedicação de sua parte.

À Beatriz, por sua simples existência nesse mundo, o que torna minha vida infinitamente mais feliz! Por seu amor, carinho, dedicação e paciência que fazem dela a pessoa mais incrível no mundo todo!

Ao meu irmão Patrick, que desde muito pequeno sempre me serviu de inspiração e modelo de caráter, mesmo que às vezes lhe falte um pouco de paciência e “molejo” no trato com as pessoas.

Ao meu irmão Fábio, por mostrar o caminho a não ser seguido e mesmo assim presentear a todos com a existência da minha sobrinha Mariana.

Sou extremamente grato ao meu orientador, Prof. Miguel Nosedá, pela confiança depositada no meu trabalho, pelos ensinamentos, por ajudar a desenvolver minhas capacidades e por ter se tornado um bom amigo.

À minha Coorientadora, Prof^a Maria Eugênia pelas colaborações no desenvolvimento do trabalho e experiência compartilhada.

A todos os alunos e colegas que passaram pelos laboratórios 248 e E3 durante esses quatro anos de convivência. Não vou me arriscar a citá-los nominalmente para não incorrer em injustiças (Alzheimer lembrem!?). Sem dúvidas a troca de experiências no laboratório discutindo ideias, metodologias e resultados tem enorme

contribuição na formação do pesquisador, mas são os momentos de distração, conversa descompromissada e os “assuntos polêmicos do dia” que movimentam a rotina e fazem deste um grupo de pesquisa diferenciado. Obrigado a todos vocês!

Às professoras Luciana Ribas e Érika Amano do Departamento de Botânica pela orientação na condução dos bioensaios com as orquídeas e pela possibilidade de estabelecer uma cooperação entre os departamentos.

À Dr^a Mariana Mazetto pelas análises de potencial zeta realizadas no Departamento de Química.

Aos professores do NFN do Departamento de Bioquímica pela disponibilidade da estufa para realização dos bioensaios com alface.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica, em especial à Flávia pela incansável ajuda com as análises de HPLC-MS.

Ao Centro de RMN, representado na figura do Arquimedes, pela realização das análises de ressonância.

Ao CME pela realização das análises de MEV.

Ao NPDEAS pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao CNPq pela disponibilidade da bolsa e à CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Paraná por ter me acolhido por 10 anos durante toda minha trajetória acadêmica e permitir que eu possa trilhar um caminho na pesquisa científica.

RESUMO

A biomassa de microalgas apresenta em sua composição uma grande variedade de moléculas com aplicações biotecnológicas. Com base nesse potencial, o presente trabalho teve como objetivo a produção de biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus* para obtenção de compostos com atividade bioestimulante vegetal. A metodologia experimental consistiu primeiramente no desenvolvimento de um fotobiorreator para cultivo da microalga em condições fotoautotróficas, seguida da avaliação de estratégias de recuperação da biomassa por floculação utilizando quitosana como agente floculante. A biomassa recuperada por floculação foi submetida a extrações sequenciais para obtenção de extratos aquosos que foram avaliados quanto a sua composição química e determinação da melhor condição de extração. O extrato selecionado foi fracionado por cromatografia de adsorção em coluna de sílica para avaliação da atividade de seus componentes isolados. A atividade bioestimulante vegetal do extrato e suas frações foi avaliada utilizando bioensaios nos estádios de germinação, produção de mudas e aplicações foliares em *Lactuca sativa*; determinação de atividade auxínica e citocinínica em bioensaios com cotilédones de *Cucumis sativus*; e na germinação assimbiótica e produção de mudas da orquídea *Cattleya warneri*. Como primeiro resultado foi desenvolvido um fotobiorreator de placa plana com capacidade de 100 L que permitiu a produção da biomassa utilizada nas demais etapas. A utilização da quitosana na recuperação da biomassa apresentou aproximadamente 99% de eficiência de floculação e não comprometeu a composição da biomassa, que foi utilizada para obtenção do extrato aquoso contendo monossacarídeos e diferentes glicosídeos, além do fitormônio *trans*-zeatina (46 ng mg⁻¹) e traços de ácido abscísico. Os bioensaios com alface indicaram maior atividade bioestimulante do extrato na promoção do crescimento do sistema radicular referente a concentração de 4,0 g L⁻¹, enquanto o sistema foliar apresentou melhores resultados na concentração de 1,0 g L⁻¹. Os bioensaios com cotilédone de pepino indicaram atividade citocinínica do extrato aquoso, mas não de suas frações, enquanto a atividade auxínica foi mais significativa em três das frações obtidas. A germinação assimbiótica de sementes de orquídea e a produção de mudas foram positivamente afetadas pela adição do extrato no meio de cultura, promovendo a obtenção de protocormos e plântulas em estádios de desenvolvimento mais adiantados do que nos tratamentos controle. A análise dos resultados permite concluir que os efeitos observados nos bioensaios são devidos a interações sinérgicas entre as moléculas do extrato, reforçando o potencial uso das microalgas como uma fonte renovável de compostos com atividade bioestimulante vegetal.

Palavras-chave: Fotobiorreator. Floculação. Bioestimulante vegetal. Microalgas. Fitormônios.

ABSTRACT

The microalgae biomass presents in its composition a great variety of molecules with biotechnological applications. Based on this potential, the present work had the objective of producing biomass of the microalga *Desmodesmus subspicatus* to obtain compounds with plant biostimulant activity. The experimental methodology consisted in the development of a photobioreactor for microalgae cultivation under photoautotrophic conditions, followed by the evaluation of biomass recovery strategies by flocculation using chitosan as a flocculating agent. The biomass recovered by flocculation was submitted to sequential extractions to obtain aqueous extracts that were evaluated for their chemical composition and determination of the best extraction condition. The selected extract was fractionated by adsorption chromatography on a silica column to evaluate the activity of its isolated components. The plant biostimulating activity of the extract and its fractions was evaluated using bioassays in the stages of germination, seedling production and foliar applications in lettuce plants (*Lactuca sativa*); determination of auxin- and cytokinin-like activity in bioassays with cucumber cotyledon (*Cucumis sativus*); and on the asymbiotic germination and seedling production of the orchid *Catleya warneri*. A flat plate photobioreactor with 100 L capacity was developed, which allowed the production of the biomass used in the other stages. The use of chitosan in the recovery of biomass presented approximately 99% of flocculation efficiency and did not compromise the composition of the biomass, which was used to obtain the aqueous extract containing monosaccharides and different glycosides, in addition to trans-zeatin (46 ng mg⁻¹) and traces of abscisic acid. The bioassays with lettuce showed higher biostimulating activity of the extract in promoting the growth of the root system in relation to the concentration of 4.0 g L⁻¹, while the foliar system showed better results in the 1.0 g L⁻¹ concentration. The cucumber cotyledon bioassays indicated the cytokinin-like activity of the aqueous extract, but not of its fractions, whereas the auxin-like activity was more significant in three of the fractions obtained. The asymbiotic germination of orchid seeds and the production of seedlings were positively affected by the addition of the extract in the culture medium, promoting the obtention of protocorms and seedlings at more advanced stages of development than in the control treatments. Analysis of the results allows us to conclude that the observed effects in the bioassays are due to synergic interactions among the molecules of the extract, reinforcing the potential use of microalgae as a renewable source of compounds with plant biostimulating activity.

Keywords: Photobioreactor. Flocculation. Biostimulating activity. Microalgae. Phytohormones.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE.....	22
FIGURA 2 – FOTOBIOREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES.....	39
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO FOTOBIOREATOR SEM UMA DAS PLACAS LATERAIS DE ILUMINAÇÃO.....	40
FIGURA 4 – FOTOBIOREATOR SEM AS PLACAS LATERAIS DE ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	41
FIGURA 5 – SISTEMA DE AERAÇÃO E INJEÇÃO DE GASES NO INTERIOR DO FOTOBIOREATOR.	42
FIGURA 6 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY</i>	47
FIGURA 7 – BIOMASS DRY WEIGHT OF <i>D. subspicatus</i> AND pH PROFILE ALONG 14 DAYS.....	54
FIGURA 8 – JAR TEST SCALE EXPERIMENTS VARYING CHITOSAN DOSAGE AND pH.....	56
FIGURA 9 – ZETA (ζ -) POTENTIAL OF FLOCCULATED BIOMASS IN THE JAR TEST BIOASSAYS	57
FIGURA 10 – SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF FRESH CULTURE (A,B) AND FLOCCULATED BIOMASS (C,D)	59
FIGURA 11 – SCHEMATIC VIEW OF FLOCCULATION BRIDGING MECHANISM IN PHOTOBIOREACTOR MICROALGAE CULTURE	60
FIGURA 12 – TG AND DTG CURVES OF THE BIOMASS FLOCCULATED (A) AND CENTRIFUGED (B)	61
FIGURA 13 – CARBOHYDRATES (CHO), PROTEINS (PTN) AND LIPIDS (LPD) CONTENT IN THE BIOMASSES BY COLORIMETRIC AND GRAVIMETRIC ANALYSIS.....	63

FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS SEQUENCIAIS DA BIOMASSA MICROALGAL	74
FIGURA 15 – CURVAS DE TG E DTG DOS EXTRATOS Ec1 E Ef1	84
FIGURA 16 – ASSINALAMENTOS DE C-1 POR RMN DE ¹³ C DOS EXTRATOS Ec1 E Ef1	86
FIGURA 17 – ESTRUTURA DOS GLICOSÍDEOS E MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO AQUOSO	88
FIGURA 18 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE REGULADORES VEGETAIS	90
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DA ZEATINA NO EXTRATO AQUOSO	91
FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DAS PLÂNTULAS APÓS GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE	92
FIGURA 21 – COMPRIMENTO TOTAL DAS RAÍZES NAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO.....	93
FIGURA 22 – COMPRIMENTO TOTAL DOS HIPOCÓTILO DAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO.....	94
FIGURA 23 – SUPERFÍCIE FOLIAR DAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO.....	95
FIGURA 24 – BIOENSAIOS COM MUDAS DE ALFACE EM BANDEJAS DE POLIESTIRENO.....	96
FIGURA 25 – COMPRIMENTO TOTAL DAS RAÍZES DAS MUDAS DE ALFACE CRESCIDAS EM BANDEJA	96
FIGURA 26 – MASSA SECA RADICULAR DAS MUDAS DE ALFACE CRESCIDAS EM BANDEJA	97
FIGURA 27 – SUPERFÍCIE FOLIAR DAS MUDAS DE ALFACE CRESCIDAS EM BANDEJA.....	98
FIGURA 28 – MASSA SECA FOLIAR DAS MUDAS DE ALFACE CRESCIDAS EM BANDEJA.....	99

FIGURA 29 – BIOENSAIO COM PLANTAS DE ALFACE EM VASOS INDIVIDUAIS TRATADAS POR PULVERIZAÇÃO FOLIAR.....	100
FIGURA 30 – SUPERFÍCIE FOLIAR NAS PLANTAS ADULTAS DE ALFACE TRATADAS POR PULVERIZAÇÃO FOLIAR.....	100
FIGURA 31 – MASSA SECA FOLIAR DAS PLANTAS ADULTAS DE ALFACE TRATADAS POR PULVERIZAÇÃO FOLIAR.....	101
FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA	104
FIGURA 33 – RMN DE ¹ H DO EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS EM COLUNA DE SÍLICA.....	105
FIGURA 34 – PERFIL DE ELUIÇÃO E ESPECTRO DE MASSAS DO ABA NA FRAÇÃO F1	108
FIGURA 35 – BIOENSAIOS DE REFERÊNCIA PARA ATIVIDADE AUXÍNICA E CITOCINÍNICA EM COTILÉDONES DE PEPINO	109
FIGURA 36 – CURVA DE REFERÊNCIA DE ZEATINA E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE CITOCINÍNICA.....	110
FIGURA 37 – CURVA DE REFERÊNCIA DE AIA E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE AUXÍNICA PARA NÚMERO E RAÍZES	111
FIGURA 38 – CURVA DE REFERÊNCIA DE AIA E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE AUXÍNICA PARA COMPRIMENTO E RAÍZES	113
FIGURA 39 – ANÁLISE DE TLC DO EXTRATO AQUOSO E SUAS FRAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	114
FIGURA 40 – PROTOCORMOS PRODUZIDOS POR GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA APÓS 90 DIAS DE CULTIVO	133
FIGURA 41 – MASSA SECA DOS PROTOCORMOS APÓS 90 DIAS DE GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA	134
FIGURA 42– PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CINETINA RIBOSÍDEO NOS PROTOCORMOS APÓS GERMINAÇÃO	136
FIGURA 43 – QUANTIFICAÇÃO DE CINETINA RIBOSÍDEO NOS PROTOCORMOS APÓS GERMINAÇÃO	137

FIGURA 44 – PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS PRODUZIDAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO	139
FIGURA 45 – NÚMERO E COMPRIMENTO DAS FOLHAS DAS PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO	140
FIGURA 46 – NÚMERO E COMPRIMENTO DAS RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO	141
FIGURA 47 – MASSA SECA DAS PLÂNTULAS OBTIDAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO.....	142
FIGURA 48 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDO ABSCÍSICO NAS PLÂNTULAS APÓS TRANSPLANTIO	143
FIGURA 49 – QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO NAS PLÂNTULAS APÓS TRANSPLANTIO.....	144

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – BIOMASS RECOVERY AND CONCENTRATION FACTOR IN THE JAR TEST BIOASSAYS.....	58
TABELA 2 – COMPOSITION OF CENTRIFUGED AND FLOCCULATED BIOMASSES BY THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS.....	62
TABELA 3 – GRADIENTE DE SOLVENTES NA FASE MÓVEL PARA ANÁLISE DE FITORMÔNIOS EM HPLC-MS.....	77
TABELA 4 – RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	82
TABELA 5 – ASSINALAMENTOS DOS CARBONOS ANOMÉRICOS NOS EXTRATOS AQUOSOS.....	87
TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DOS PADRÕES DE REGULADORES VEGETAIS USADOS PARA ANÁLISE DE HPLC-MS.....	89
TABELA 7 – ASSINALAMENTOS DE H-1 E J1,2 NAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido abscísico

AIA – Ácido Indol acético

BA – Benzil adenina

BAR – Benzil adenosina

C- – Controle Negativo

C+ – Controle Positivo

CHO – Carboidratos

CME – Centro de Microscopia Eletrônica

DTG – Derivada Termogravimétrica

DZ – Di-hidrozeatina

FBR – Fotobiorreator

GA₃ – Ácido giberélico

Galp – Galactopirranose

GC – Gas chromatography

GlcP – Glucopirranose

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

J – Constante de acoplamento

K – Cinetina

KR – Cinetina ribosídeo

LED – Light emitting diode

LPD – Lipídeos

Manp – Manopirranose

MS – Mass Spectrometry

PTFE – Politetrafluoretileno

PTN – Proteínas

Q-TOF – Time of flight

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SEM – Scanning electron microscopy

TFA – Ácido trifluoroacético

TGA – Thermogravimetric analysis

TLC – Thin layer chromatography

Z – Zeatina

ZR – Zeatina ribosídeo

α – Configuração anomérica alfa

β – Configuração anomérica beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.....	22
CAPÍTULO 1:DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICROALGAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA		24
1	INTRODUÇÃO	25
2	DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE: FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES	26
3	CONCLUSÕES	44
CAPÍTULO 2:RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL PRODUZIDA EM FOTOBIORREATOR POR FLOCULAÇÃO UTILIZANDO QUITOSANA COMO AGENTE FLOCULANTE		45
1	INTRODUÇÃO	46
2	ARTIGO PUBLICADO: BIOMASS PRODUCTION AND HARVESTING OF <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVATED IN FLAT PLATE PHOTOBIOREACTOR USING CHITOSAN AS FLOCCULANT AGENT ...	47
3	CONCLUSÕES	68
CAPÍTULO 3: ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL DO EXTRATO AQUOSO E SUAS FRACÇÕES		69
1	INTRODUÇÃO	70
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	73
3.1	Extrações aquosas sequenciais da microalga.....	73
3.2	Análise termogravimétrica	74

3.3	Determinação de carboidratos totais	75
3.4	Determinação de proteínas	75
3.5	Determinação da composição monossacarídica por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (GC-MS).....	75
3.6	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H	76
3.7	Determinação de fitormônios por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS).....	76
3.8	Determinação da atividade bioestimulante vegetal	77
3.8.1	Bioensaios de germinação e crescimento inicial de alface (<i>L. sativa</i>)	78
3.8.2	Aplicações foliares do extrato aquoso em plântulas de alface (<i>L. sativa</i>) germinadas em bandejas de poliestireno	78
3.8.3	Aplicações foliares do extrato aquoso em plantas de alface (<i>L. sativa</i>) transplantadas para vasos individuais	79
3.9	Fracionamento do extrato aquoso por cromatografia de adsorção em coluna de sílica	79
3.10	Determinação da atividade citocinínica e/ou auxínica das frações obtidas por cromatografia de adsorção em coluna de sílica	80
3.11	Tratamento estatístico	81
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	116
CAPÍTULO 4: EXTRATO DE MICROALGAS COMO ADITIVO NO MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA <i>IN VITRO</i> E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS		124
1	INTRODUÇÃO	125
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	125
3	MATERIAL E MÉTODOS	127
3.1	Extrato aquoso da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	127
3.2	Germinação assimbiótica de orquídeas e produção de plântulas	127

3.2.1	Obtenção das sementes e teste de viabilidade	127
3.2.2	Desinfestação das sementes e meio de cultura	128
3.2.3	Germinação assimbiótica	129
3.2.4	Produção de plântulas	129
3.3	Determinação dos fitormônios nos protocormos e plântulas produzidos <i>in vitro</i>	129
3.4	Análise estatística.....	130
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
5	CONCLUSÃO.....	145
	REFERÊNCIAS	146
5	CONCLUSÕES FINAIS	148
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	149
	APÊNDICE 1 - CULTIVO DA MICROALGA DURANTE 14 DIAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA	150
	ANEXO 1 - FORMULÁRIO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE DO FOTOBIOREATOR	151
	ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO ARTIGO PUBLICADO.....	156

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente as microalgas têm sido objeto de interesse da pesquisa científica, entretanto, na última década o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a produção e exploração de biomassa microalgal para fins biotecnológicos tem ganhado crescente destaque.

O interesse por essa fonte de compostos deve-se a características fisiológicas e bioquímicas desses micro-organismos, como sua elevada eficiência fotossintética, altas taxas de crescimento, estrutura unicelular, habilidade de crescimento em condições heterotróficas e em águas residuais, etc. Outro fator vantajoso reside na possibilidade de integração entre diferentes processos de produção, aproveitando ao máximo as diferentes potencialidades das microalgas.

Devido ao seu potencial biotecnológico, inúmeros compostos de interesse podem ser obtidos a partir da biomassa de diferentes espécies microalgais. Ácidos graxos poli-insaturados (*Schizochytrium* sp.) e carotenoides (*Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*) oriundos de microalgas já são comercializados por empresas farmacêuticas como produtos nutracêuticos. Além disso, microalgas como *Arthrospira platensis* e *Chlorella* sp. são comercializadas como suplemento alimentar. Diversos trabalhos científicos têm demonstrado que compostos microalgais, como alguns carboidratos possuem ação antioxidante, atividade antitumoral, ação bioestimulante, dentre outros, consolidando a ideia de que a biomassa de microalgas possui ampla aplicação biotecnológica. Ademais, a produção de fitormônios por microalgas também tem sido explorada. Auxina, ácido abscísico, citocininas e giberelinas já foram encontrados em uma variedade de espécies de microalgas.

Apesar de suas inúmeras vantagens para variadas aplicações biotecnológicas, a produção de biomassa em grande escala apresenta algumas limitações relacionadas à viabilidade econômica dos processos. Por essa razão, a realização de pesquisas que objetivem o desenvolvimento de novas estratégias para produção e utilização das microalgas é fundamental para o avanço dos conhecimentos nessa área de estudo.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de bioestimulantes e biofertilizantes para uso na agricultura é uma das potenciais aplicações para a biomassa de microalgas e seus compostos, uma vez que vários trabalhos demonstram a existência de fitormônios e outras moléculas que podem atuar na regulação dos processos de desenvolvimento vegetal. Além disso, a efetividade da ação das microalgas para aumentar as respostas de crescimento e produção em plantas tem sido descrita na literatura.

Com base nesse potencial biotecnológico da utilização das microalgas como fonte de compostos com atividade bioestimulante relatado na literatura e baseado nos resultados de trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa é de fundamental importância expandir o conhecimento já estabelecido através do emprego de diferentes metodologias de cultivo e recuperação da biomassa, avaliação do extrato de microalgas como bioestimulante vegetal, e determinação da estrutura química e função dos compostos responsáveis pela atividade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral contido no presente trabalho consiste na produção de biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus* em fotobiorreator para obtenção de compostos com potencial atividade bioestimulante vegetal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral delimitado na seção anterior foram definidos objetivos específicos que refletem a sequência de metodologias experimentais executadas.

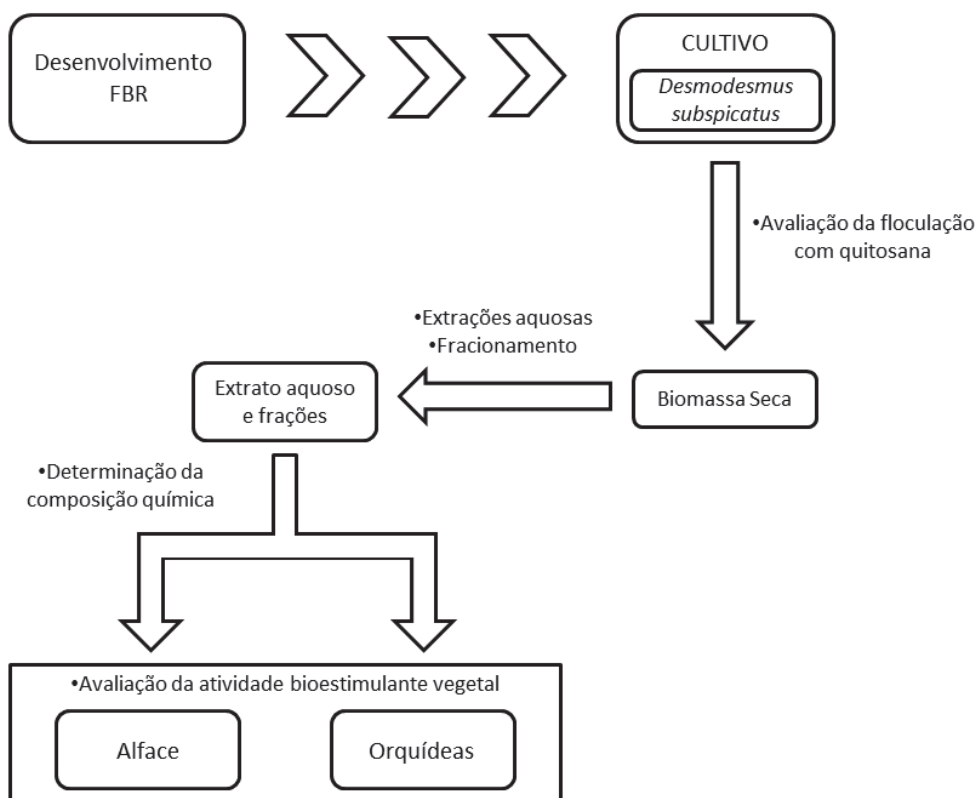
- Desenvolver um fotobiorreator de bancada para realizar a produção de biomassa de microalgas em uma escala que atenda as demais demandas do projeto;

- Avaliar estratégias de recuperação da biomassa produzida por floculação utilizando quitosana como agente floculante;
- Avaliar a atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus* no crescimento de plantas de alface em diferentes estádios de desenvolvimento vegetativo e sua composição bioquímica;
- Avaliar o fracionamento do extrato aquoso por cromatografia de adsorção em sílica para determinar de maneira mais efetiva a ação dos compostos sobre o desenvolvimento dos vegetais, correlacionando as respostas com ação de fitormônios;
- Avaliar a ação do extrato aquoso como aditivo no meio de cultura para propagação *in vitro* da orquídea *Cattleya warneri*.

4 ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

A fim de apresentar um panorama geral das atividades realizadas na execução deste projeto foi elaborada a estratégia experimental que foi adotada durante as diferentes etapas (Figura 1).

FIGURA 1 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE



A estratégia experimental na execução da presente tese consistiu no desenvolvimento de um fotobiorreator para cultivo de microalgas, produção e recuperação da biomassa, extração e caracterização de compostos para avaliação da atividade bioestimulante vegetal em diferentes modelos. Os resultados serão apresentados na forma de capítulos, sendo cada um referente a cada etapa da pesquisa, sendo intitulados:

- Capítulo 1: Desenvolvimento de fotobiorreator para cultivo de microalgas e produção de biomassa;
- Capítulo 2: Recuperação da biomassa microalgal produzida em fotobiorreator por floculação utilizando quitosana como agente floculante;
- Capítulo 3: Atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso e suas frações;
- Capítulo 4: Extrato de microalgas como aditivo no meio de cultura para germinação assimbiótica *in vitro* e formação de plântulas de orquídeas.

CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO DE FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICROALGAS E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

1 INTRODUÇÃO

Em larga escala, os cultivos de microalgas são comumente realizados de duas maneiras: Sistemas abertos, tais como tanques ou lagoas, ou ainda em sistemas fechados como fotobiorreatores. De modo geral, a utilização de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas possui algumas vantagens, dentre as quais é possível destacar o maior controle das condições, uma vez que o sistema é fechado e não há contato com o ambiente externo, reduzindo a probabilidade de contaminação por organismos diferentes dos cultivados e a redução da perda excessiva por evaporação, o que é agravado em dias quentes e secos nos cultivos abertos. Fotobiorreatores possuem ainda elevada eficiência na produção de biomassa quando utilizada injeção de CO₂ no meio, potencializando multiplicação celular.

O avanço da produção industrial associada com exploração do potencial das microalgas passa pelo desenvolvimento de sistemas de cultivo que sejam capazes reunir as características anteriormente mencionadas. Essa necessidade de desenvolvimento também se faz presente no setor acadêmico, uma vez que o desenvolvimento de sistemas de cultivo em escala laboratorial permite a realização de estudos que aproximem a realidade da bancada com a industrial, favorecendo assim o escalonamento dos processos investigados.

Por essa razão a primeira etapa de execução do presente projeto consistiu no desenvolvimento de um fotobiorreator de 100 L para atender as demandas de produção de biomassa relacionadas as demais etapas da pesquisa, bem como permitir que demais integrantes do grupo de pesquisa utilizem o sistema. O documento apresentado no Capítulo 1 consiste no pedido de depósito de patente de um FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), sendo assim sua formatação segue o modelo estabelecido para essa finalidade.

2 DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE: FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

Campo da Invenção

A presente invenção está relacionada ao desenvolvimento de sistemas para cultivo de micro-organismos. Mais precisamente, refere-se a um fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, em especial microalgas marinhas ou dulciaquícolas cultivadas em condições fotoautotróficas, onde se faz necessária a construção do reator com material translúcido para permitir a passagem de luz para o interior da câmara de cultivo.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

O interesse em novas tecnologias que viabilizem a produção de biomassa de microalgas tem ganhado espaço no meio acadêmico e industrial na última década, sobretudo devido às inúmeras possibilidades de exploração dessa matéria-prima, quer seja para geração de biocombustíveis como o biodiesel, o etanol ou mesmo o hidrogênio, ou ainda pela composição da biomassa rica em proteínas, pigmentos e moléculas de interesse para as áreas de nutrição humana, suplementação animal e variados usos biotecnológicos. Além de sua utilização para fins comerciais, os cultivos de microalgas são reconhecidos como importantes ferramentas para o estudo de diversos fenômenos ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos, sendo fundamentais para obtenção de informação relacionada à ciência básica e estudo destes micro-organismos.

Pesquisas com microalgas têm sido desenvolvidas para diferentes aplicações comerciais. Como micro-organismos fotossintetizantes, as microalgas contêm pigmentos que podem ser usados para fins alimentares e cosméticos, podem ainda ser usadas na indústria farmacêutica, uma vez que algumas espécies produzem compostos bioativos, tais como os antioxidantes. Além disso, a biomassa das microalgas é empregada como suplemento nutricional para o consumo humano, devido à presença de proteínas, vitaminas, polissacarídeos, ácidos graxos poli-insaturados dentre outros nutrientes.

O reflexo da crescente atenção direcionada às microalgas é o surgimento de um novo nicho tecnológico que possui, como uma das maiores potencialidades a ser explorada, a possibilidade de integração entre sistemas de cultivo para produção de

biomassa e o tratamento de emissões diversas, com a principal vantagem de aumentar a produtividade dos sistemas, aliada ao aspecto ambiental da redução de poluentes na atmosfera, como o dióxido de carbono (CO_2) e os óxidos de nitrogênio (NO_x). Como seres fotossintetizantes, as microalgas possuem a capacidade de converter biologicamente o CO_2 presente em emissões diversas em biomassa, apresentando como resultado desse processo a produção de oxigênio (O_2).

Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias para produção de biomassa de microalgas os cultivos ainda esbarram em limitações tecnológicas, especialmente relacionadas à manutenção e viabilidade das condições da cultura. A interação entre fatores físicos, químicos e biológicos influencia diretamente no cultivo de microalgas, podendo promover ou inibir seu crescimento. Os fatores biológicos estão associados ao metabolismo celular e a presença de contaminantes no sistema, enquanto os fatores físicos e químicos estão relacionados aos efeitos provocados pela luz, temperatura, pH e disponibilidade de fontes de carbono e outros nutrientes.

Dentre os fatores físicos, talvez o mais importante em cultivos fotoautotróficos seja a iluminação, uma vez que a intensidade luminosa está diretamente relacionada à etapa fotoquímica da fotossíntese, quando ocorre a absorção da luz através de pigmentos como a clorofila, síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e a fotólise da água. Em termos gerais, a fotossíntese pode ser definida como o processo pelo qual a energia luminosa possibilita a síntese de carboidratos e liberação de oxigênio a partir de dióxido de carbono e água, sendo que a quantidade de luz recebida pelas células em cultivo está diretamente relacionada ao crescimento das culturas. Entretanto, o excesso de luz pode ocasionar o fenômeno de fotoinibição, um complexo conjunto de processos moleculares entendido como a inibição da fotossíntese pelo excesso de luz. Devido à importância da energia luminosa no crescimento de micro-organismos fotossintetizantes, os fotobiorreatores necessitam ser construídos com materiais translúcidos, a fim de maximizar a captação de luz pelas células em cultivo, bem como possuírem sistemas de iluminação artificial para viabilizar a realização de cultivos em condições de ausência de iluminação natural.

Outro fator físico relevante para a máxima geração de biomassa é a aeração. Em cultivos densos ou em grandes volumes é necessária a utilização de sistemas de aeração que proporcionem o borbulhamento de ar ou mistura de gases no interior dos cultivos. Esse processo de mistura do meio possibilita às células melhor aproveitamento da luz, proporciona a homogeneização de nutrientes e favorece a

troca gasosa, como consequência acaba por aumentar a produtividade de biomassa. Um fator que possui fundamental importância para o crescimento das microalgas em cultivo é a concentração de CO₂ injetado nos sistemas, sendo comumente empregado o uso de fontes diversas para aumentar a produção de biomassa.

Na literatura científica são relatados resultados de produção de biomassa de microalgas do gênero *Scenedesmus* em cultivo autotrófico com adição de CO₂ em concentrações variando entre 2 e 20% alcançando resultados de geração de biomassa significativamente superiores ao uso do ar ambiente, indicando que a adição de CO₂ aos cultivos possibilita o aumento da produtividade. Além de dados da utilização de CO₂ puro aos cultivos, é possível encontrar resultados da adição de emissões diversas, desde a utilização de gases originários da combustão de gasolina, diesel, carvão ou resíduos sólidos. Esses resultados indicam que além de aumentar a produtividade de biomassa, há redução dos teores de CO₂ presentes nos gases, bem como a redução dos teores de NO_x presente nessas emissões, o que é de grande relevância do ponto de vista ambiental.

No que diz respeito aos sistemas para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes como as microalgas, os mais empregados são do tipo tanque de corrida, que consistem de um lago artificial de baixa profundidade, com o objetivo de obter maior área de exposição à luz solar, e de um sistema de pás, que é responsável pela agitação e homogeneização do meio. Apesar de serem amplamente difundidos na produção em larga escala, em função do seu baixo custo de construção e operação simplificada, o modelo de lagoas apresenta algumas deficiências na manutenção da homogeneidade das condições de cultivo, uma vez que a exposição ao ambiente possibilita a contaminação com agentes externos, aumenta as taxas de evaporação, resulta em maior amplitude térmica decorrente das variações ambientais e cria a necessidade de uma grande área para sua construção e operação.

Diante das características dos cultivos, a utilização de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas possui algumas vantagens, dentre as quais é possível destacar o maior controle das condições bióticas e abióticas, uma vez que o sistema é fechado e não há contato com o ambiente externo, reduzindo a probabilidade de contaminação por organismos diferentes dos cultivados. A utilização de fotobiorreatores possui ainda a vantagem de ocupar uma área menor do que a dos sistemas abertos e, portanto, não há competição pelo uso de áreas agriculturáveis que poderiam ser utilizadas para produção de alimentos, quando comparados uma escala de produção industrial.

Fotobiorreatores possuem ainda elevada eficiência na produção de biomassa quando utilizada injeção de CO_2 no meio, potencializando o crescimento das microalgas. Atualmente existe uma grande variedade de modelos de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas, relatados no estado da arte, destinados ao desenvolvimento de culturas em escala laboratorial para investigação científica, ou ainda destinados à produção massiva de biomassa. No entanto, as tecnologias demonstradas nos documentos não resolvem de forma eficaz os problemas mencionados acima. A seguir são descritos modelos de fotobiorreatores propostos para o cultivo de microalgas e suas particularidades de construção e operação.

O invento BR1120130284811 descreve um fotobiorreator destinado à cultura em regime contínuo de micro-organismos fotossintéticos, preferencialmente microalgas, compreendendo pelo menos um compartimento de cultura destinado a conter o meio de cultura dos micro-organismos, e pelo menos uma fonte luminosa externa ao compartimento de cultura, caracterizado pelo fato de compreender, além disso, pelo menos um elemento difusor de luz cilíndrico ou prismático colocado no compartimento de cultura de forma a captar os fótons emitidos pela fonte luminosa e os restituí-los no meio de cultura por sua superfície lateral. Apesar de aumentar a eficiência de captação de fótons pelas células através da reflexão da luz no sistema, a disposição dos refletores tende a ocasionar o aumento da temperatura dos cultivos, uma vez que limita a transferência de calor entre a superfície do reator e o meio externo o que pode reduzir ou mesmo impossibilitar o crescimento das microalgas.

O invento PI10009256A2 refere-se a um fotobiorreator fechado, tipo tanque, que utiliza energia luminosa solar e/ou artificial inserida na câmara de cultura. O equipamento é caracterizado por compreender uma câmara de cultura, com ao menos uma fonte de luz posicionada em seu interior; um compartimento estanque; paredes transparentes ou translúcidas; uma placa inferior com superfície interna espelhada; baterias para o abastecimento energético e dispositivo de processamento. A localização da fonte luminosa imersa no interior do cultivo pode resultar em distribuição mais uniforme da luminosidade, entretanto, cabe ressaltar que a introdução de objetos no interior da câmara de cultivo pode ocasionar a formação de biofilme em suas paredes, em função da deposição de partículas durante a homogeneização do meio. Ademais, a presença do sistema de iluminação submersa cria obstáculos relacionados a manutenção dos sistemas elétricos do fotobiorreator,

podendo ainda ocasionar a contaminação dos cultivos através da introdução de organismos distintos aos desejados.

A invenção BR1120120021214 descreve um reator para a cultura de organismos fotossintéticos ou células de plantas, compreendendo uma câmara de cultura feita de material transparente para proporcionar radiação fotossinteticamente ativa e uma estrutura rígida consistindo de uma base e colunas verticais, que apresentam uma extremidade (inferior) inserida diretamente dentro da base contínua, enquanto as extremidades superiores são conectadas em partes unidas por meio de uma única barra de conexão horizontal. O reator proposto é caracterizado por não possuir sistema de fornecimento de gases às células em cultivo. A ausência de um sistema de aeração pode inviabilizar o crescimento dos cultivos pela carência de CO₂ necessário para a realização da fotossíntese e pela precipitação das células em suspensão.

A invenção PI08224919 descreve um fotobiorreator que compreende uma câmara para cultura de micro-organismos fotossintetizantes e um distribuidor claro. Cada distribuidor claro tem uma superfície arranjada para receber a luz e outra superfície disposta para emitir pelo menos parte da luz recebida. O distribuidor é submerso parcialmente no meio aquoso que compreende a cultura fotossintética. A luz pode ser distribuída eficientemente no líquido por meios relativamente simples e baratos. O sistema distribuidor proposto consiste de uma estrutura cônica de plástico transparente flutuante na superfície do meio aquoso, o que pode acarretar contaminação por agentes externos ao cultivo, uma vez que há contato com o meio circundante.

O pedido de patente BR1120120051466 apresenta um fotobiorreator compreendendo um receptáculo com uma primeira e segunda superfície lateral externa, em que o receptáculo é formado de um material flexível, impermeável e transparente, disposto em uma cremalheira dotada de elementos de suporte alongados substancialmente verticais, dispostos pelo menos em uma fileira horizontal, nos quais os elementos de suporte encostam, de modo alternado contra as primeiras e segundas superfícies laterais externas do receptáculo. De modo simplificado, o sistema de cultivo consiste em um compartimento de material flexível e transparente fixado entre suportes verticais de modo alternado, formando uma configuração em zigue-zague. Apesar de possuir baixo custo de construção, a ausência de um sistema de fornecimento de gases acaba por limitar o crescimento do cultivo, somado ao fato

da ausência de agitação/homogeneização favorecer a formação de biofilme nas paredes do receptáculo proposto.

A invenção PI09153047A2 descreve um fotobiorreator flexível de baixo custo com formato de um corpo transparente flexível alongado adaptado para ser posicionado em corpo d'água, um sistema de distribuição de gás alongado no sentido longitudinal do reator responsável por fornecer nutrientes através da injeção de uma mistura de gases na suspensão líquida, um sistema de preenchimento/drenagem para controle do volume do cultivo e pelo menos uma abertura para evacuação dos gases gerados. Apesar de possuir baixo custo de construção, a utilização de materiais flexíveis como polímeros plásticos para confecção de um fotobiorreator pode ocasionar o extravasamento do cultivo em decorrência de perfurações ou fissuras na estrutura, o que demanda especial atenção em sistemas concebidos para operar na superfície de corpos d'água, a fim de evitar a perda do volume de cultivo e a possível contaminação do meio no qual o fotobiorreator está situado.

A invenção PI09073760 descreve um fotobiorreator fechado para cultivo de microalgas produzido em polímero plástico transparente e disposto horizontalmente sobre um corpo d'água artificial, tal como um lago ou tanque, a fim de promover a sustentação necessária ao sistema. Apesar da flutuação do conjunto garantida pela superfície da água, a construção fotobiorreatores em plástico flexível pode ocasionar o extravasamento do volume em cultivo para o meio externo, em função da degradação da superfície plástica exposta às variações ambientais. Dessa forma, a redução dos custos alcançada pela utilização de materiais com baixo custo de mercado pode se apresentar como entrave operacional do sistema, ocasionando perdas no processo.

O invento US20130230904A1 descreve um fotobiorreator de placa plana com superfícies laterais modificadas de modo a gerar regiões expostas à luminosidade e regiões sombreadas. Essa característica de luminosidade variável é obtida através de alterações na construção das superfícies do fotobiorreator, com adição de estruturas côncavas e/ou convexas com a finalidade de direcionar o feixe luminoso, ou ainda, introduzindo materiais opacos na estrutura. Cabe ressaltar que as características construtivas descritas no documento acima referenciado podem resultar na formação de áreas de maior concentração de biomassa nas superfícies internas da câmara de cultivo, levando à formação de biofilme ocasionado pelo fototropismo das células em

cultura, e em última análise, conduzir a um processo de obstrução à passagem da luz para o interior dos cultivos.

O pedido AU2012203478A1 descreve um fotobiorreator para o cultivo de microalgas que consiste de um compartimento de paredes transparentes para contenção das células em meio líquido, com separações longitudinais formando câmaras paralelas com as extremidades inferior e superior vedadas por canais que permitem a comunicação entre as seções individuais. O sistema de cultivo descrito permite sua construção modular, que pode ser realizada repetindo as unidades individuais para aumentar o volume final de operação, promovendo a passagem de meio entre as unidades. A geometria do fotobiorreator como apresentada pode resultar em câmaras com seção transversal insuficiente para correto escoamento do meio, bem como a homogeneização das células em cultivo, ocasionando o surgimento de biofilme nas paredes do fotobiorreator, reduzindo as taxas de crescimento e produção de biomassa.

A patente CN103025861A apresenta um sistema fotobiorreator e sua manufatura, incluindo a construção de uma unidade isolada ou a ligação de unidades individuais formando um sistema em série, garantindo característica modular ao sistema. Cada unidade possui uma superfície frontal e traseira construídas em material transparente; duas superfícies laterais construídas com materiais diversos, transparentes ou não, com armação metálica em formato de “U” que garante sustentação à estrutura. Apesar de possuir as superfícies construídas em material transparente para possibilitar a passagem de luz às células em cultivo, a inexistência de um sistema de iluminação artificial limita a utilização do fotobiorreator a condições de luminosidade natural, estando sujeito às variações ambientais do local de sua instalação.

O documento WO2014115924A1 descreve um fotobiorreator de placa plana com os painéis acoplados uns aos outros para formar uma estrutura de maior volume para permitir o cultivo de microalgas em maior escala. Cada unidade contém uma câmara de cultivo em material transparente; um sistema de injeção de gases no sentido perpendicular ao eixo longitudinal do reator; e ao menos uma estrutura divisória interna para favorecer a formação de um turbilhão e promover a mistura do meio. Ainda que a introdução de uma estrutura no interior do reator possibilite a homogeneização do meio, a existência de uma barreira física pode ocasionar redução

na velocidade de mistura, favorecendo a formação de biofilme nas áreas superficiais com menor velocidade de escoamento o fluido.

Embora os documentos citados tratem de fotobiorreatores para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, dentre estes não há nenhum modelo que descreva um sistema que reúna em suas principais características construtivas as vantagens apresentadas pelo fotobiorreator proposto no presente documento. Dentre estas características, há a existência de um sistema que permite a máxima absorção de energia luminosa, pela presença de fontes de iluminação com lâmpadas LED (*light emitting diode*) dispostas sobre placas planas removíveis, de forma a permitir uma maior eficiência no aproveitamento da incidência luminosa. Outro fator de destaque é a existência de um sistema de aeração que permite máxima solubilização e transferência de massa dos gases injetados com baixo consumo, e que atua também na homogeneização do meio aquoso, reduzindo os possíveis efeitos causados pela precipitação das células e formação de biofilme nas superfícies internas da câmara de cultivo. Cabe ressaltar ainda a estanqueidade do sistema, o que garante a manutenção das condições da cultura livre da introdução de outros micro-organismos diferentes daqueles de interesse. Por fim, o desenho construtivo do fotobiorreator proposto no presente documento permite a manutenção da temperatura no interior do sistema, garantindo condições ideais para o crescimento dos micro-organismos e máxima eficiência na produção de biomassa.

Descrição da Abordagem do Problema Técnico

Com base nas características construtivas e operacionais dos diferentes modelos de fotobiorreatores encontrados no estado da técnica, cabe ressaltar que o fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes proposto neste documento reúne diferentes características operacionais não reunidas em outro fotobiorreator do estado da técnica, permitindo, entre outras coisas, uma utilização mais eficiente e energeticamente mais econômica para o cultivo de micro-organismos. Além disso, a construção e montagem dos circuitos luminosos e conexões são muito simplificados, reduzindo os custos de construção, instalação e manutenção.

Deste modo, o objeto desta invenção apresenta elevada eficiência no aproveitamento da incidência luminosa, uma vez que sua construção é realizada em material translúcido e dispõe ainda de duas placas com uma pluralidade de lâmpadas LED (*light emitting diode*) em suas laterais para fornecimento de luz com intensidade

variável e operação em fotoperíodo, quando utilizado em ambiente fechado, mas não se limitando a essa condição e permitindo o desenvolvimento de cultivos em condições de luminosidade natural. Adicionalmente, o volume de trabalho é variável, compatível desde escalas laboratoriais até produção em escalas piloto, possibilitando assim grandes quantidades de produção de biomassa e capacidade de instrumentação para otimização das condições de cultivo.

O fotobiorreator, objeto desta invenção, exige baixo consumo de ar comprimido e/ou mistura de gases injetados, resultado da existência de um sistema de aeração que apresenta elevada eficiência na transferência de massa entre as fases gasosas e líquida em função da porosidade do dispersor de ar, o que permite a redução de custos operacionais, aliado ao fato de não ser necessário o emprego de sistemas auxiliares para circulação do meio, como bombas centrífugas, que atuam negativamente nas células em cultivo provocando a morte celular por tensões de cisalhamento no interior da bomba. A manutenção da temperatura é constante durante o período de crescimento dos micro-organismos em função da transferência de calor por convecção dos gases na porção superior do sistema. A disposição dos seus componentes foi projetada de modo a facilitar as operações de limpeza e esterilização do sistema e ausência de contaminação dos cultivos com agentes externos, além de possibilitar a recuperação da biomassa por estratégias de coagulação/floculação *in situ*, dispensando transferência de volume para outros sistemas.

O fotobiorreator proposto possibilita também a instrumentação do sistema, permitindo a instalação de sensores para monitoramento das condições de cultivo, como pH, temperatura, gases dissolvidos, dentre outros. O fotobiorreator, objeto desta invenção, permite ainda a instalação de sensores para o desenvolvimento de cultivos em modo contínuo, através da diluição constante do sistema e produção continuada de biomassa.

Cabe ressaltar que o fotobiorreator proposto no presente documento pode ser utilizado como um sistema para tratamento de efluentes diversos, uma vez que os micro-organismos fotossintetizantes em cultivo atuam na remoção da matéria orgânica presente em efluentes líquidos, utilizando compostos contendo nitrogênio, fósforo, carbono orgânico, dentre outros, como fonte de nutrientes para crescimento e produção de biomassa. De maneira similar, a utilização de emissões provenientes da queima de combustíveis fósseis ou resíduos sólidos, resulta na redução dos teores de dióxido de carbono e outros gases causadores do efeito estufa presentes na

mistura de gases empregada. Assim, o fotobiorreator, objeto desta invenção, consiste também em um sistema eficaz para tratamento de efluentes e emissões industriais.

Descrição Detalhada da Invenção

Com o objetivo de possibilitar uma correta compreensão da construção e funcionamento do sistema proposto serão apresentadas a seguir as características detalhadas do fotobiorreator.

A Figura 2 apresenta um diagrama esquemático do fotobiorreator de placa plana com estrutura de hexaedro regular de base retangular construída em material translúcido, como vidro, acrílico, plástico, PVC transparente, mas não se limitando a esses materiais translúcidos, com o objetivo de promover a passagem de luz necessária ao desenvolvimento dos micro-organismos fotossintetizantes em cultivo. Na Figura 2 são destacadas as dimensões do equipamento, com o comprimento (X) e a altura (Y) variando igualmente suas dimensões, enquanto a largura (Z) deve representar um fator de 0,25 dos eixos X e Y para manter a proporcionalidade volumétrica do reator e o correto escalonamento da construção. Tais características permitem a construção de um equipamento com volume operacional variável, possibilitando a produção de biomassa desde uma escala laboratorial até uma escala de produção piloto. Na Figura 2 ainda é possível observar as placas removíveis de iluminação compreendendo uma pluralidade de lâmpadas LED (*light emitting diode*) fixadas nas laterais de maior área da estrutura do fotobiorreator (A), de modo a possibilitar máxima exposição à luz. A existência dessas placas se faz necessária para a realização de cultivos fotoautotróficos em ambientes com ausência de luz natural. Ambas as placas laterais são mantidas na estrutura do fotobiorreator por parafusos que garantem sua fixação, além de delimitarem a proximidade da fonte luminosa das paredes laterais, garantindo a passagem de ar reduzindo a elevação da temperatura nas interfaces. Cada placa é constituída de várias fileiras paralelas de lâmpadas e de seus respectivos interruptores (B), que permitem o acionamento individual dos conjuntos de lâmpadas e o estabelecimento de regimes de fotoperíodo.

A Figura 3 apresenta o fotobiorreator com uma das placas de iluminação removida, para melhor visualização do interior do sistema, e dos parafusos responsáveis pela fixação das placas na estrutura do reator (C). A Figura 3 ilustra ainda as peças removíveis que permitem acesso ao interior do reator pela face superior, representadas deslocadas no eixo longitudinal para melhor compreensão,

com as tubulações para liberação dos gases gerados no interior do sistema (D), que possuem a função inicial de possibilitar o fluxo de gases gerados no interior do fotobiorreator e evitar o acúmulo de O_2 gerado durante a fotossíntese, bem como atuar na regulação da temperatura no interior do sistema.

A Figura 4 ilustra o sistema fotobiorreator na sua configuração que permite a realização de cultivos com luminosidade natural, ou seja, sem as placas de iluminação nas laterais. Uma vez que a estrutura é construída em material translúcido, o sistema proposto pode ser utilizado para desenvolvimento de cultivos utilizando apenas iluminação natural, dispensando a instalação das placas iluminação. Na Figura 3 ainda é possível observar a válvula posicionada na porção inferior do fotobiorreator (E), que é utilizada para coleta de amostras das culturas e recuperação da biomassa produzida, bem como o sistema de aeração (F) responsável por promover a homogeneização do sistema e fornecer CO_2 necessário ao crescimento dos micro-organismos.

Na Figura 5 é apresentado em maior detalhe o sistema de aeração do fotobiorreator proposto (F). Este aparato consiste em um medidor de vazão (G) para controle do fluxo de ar e/ou mistura de gases injetados nos cultivos; de uma tubulação plástica para condução dos gases; e de um dispersor cerâmico de gases (H) com porosidade em escala micrométrica, responsável por reduzir o diâmetro das bolhas injetadas e maximizar as trocas gasosas no interior do reator. Uma vez que o sistema não utiliza bombas para circulação da cultura em meio aquoso, a homogeneização é realizada pela injeção dos gases, promovendo a correta agitação e mistura do meio.

REIVINDICAÇÕES

1. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, caracterizado por compreender uma câmara de cultura fechada com estrutura de hexaedro regular de base retangular; sistemas de injeção e dispersão de gases e duas placas de iluminação removíveis.

2. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a câmara de cultura ser de material transparente ou translúcido.

3. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o comprimento (X) e a altura (Y) da câmara de cultura variar igualmente entre suas dimensões (1).

4. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a largura (Z) da câmara de cultura ser um fator de 0,25 dos eixos X e Y (1).

5. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as placas removíveis serem fixadas nas laterais de maior área superficial do fotobiorreator (A).

6. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por as placas removíveis de iluminação compreenderem uma pluralidade de lâmpadas LED (*Lighting Emitting Diode*) que transcorrem paralelas às paredes do reator.

7. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por as lâmpadas LED (*Lighting Emitting Diode*) serem acionadas por meio de controles individuais (B).

8. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender na parte superior do fotobiorreator tubulações plásticas para liberação dos gases (D).

9. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender na parte inferior do fotobiorreator uma válvula (E).

10. Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o sistema de injeção de gases (F) consistir de duas tubulações plásticas paralelas interligadas na extremidade superior

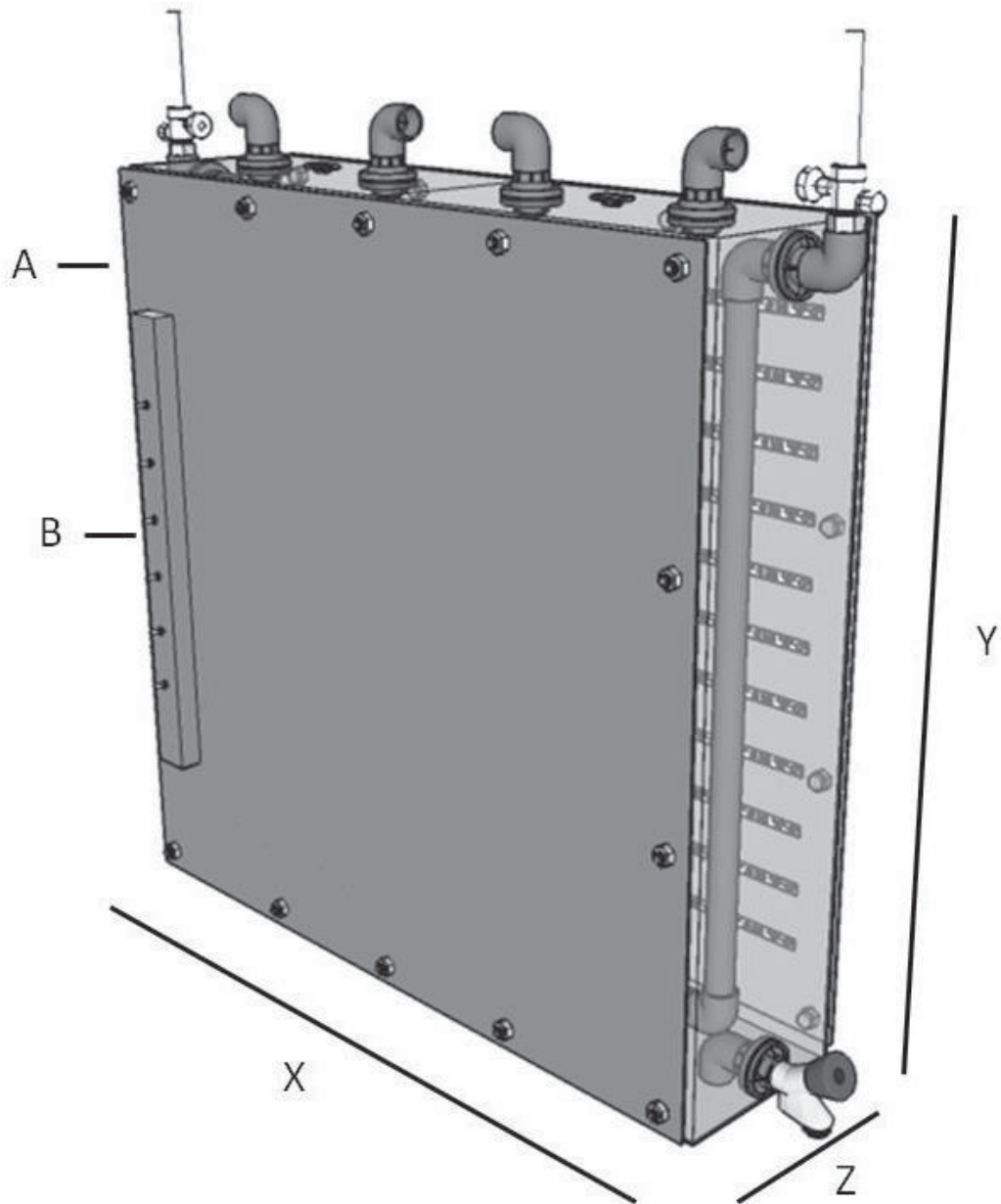
a um medidor de vazão (G) e na extremidade inferior a um dispersor cerâmico com porosidade em escala micrométrica (H).

11.Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por os dispersores cerâmicos estarem dispostos de maneira oposta um ao outro na porção inferior do interior do reator de forma perpendicular às tubulações plásticas.

12.Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por poder compreender sensores para medição de temperatura, pH, gases dissolvidos, densidade celular, ou operação de cultivos em modo contínuo.

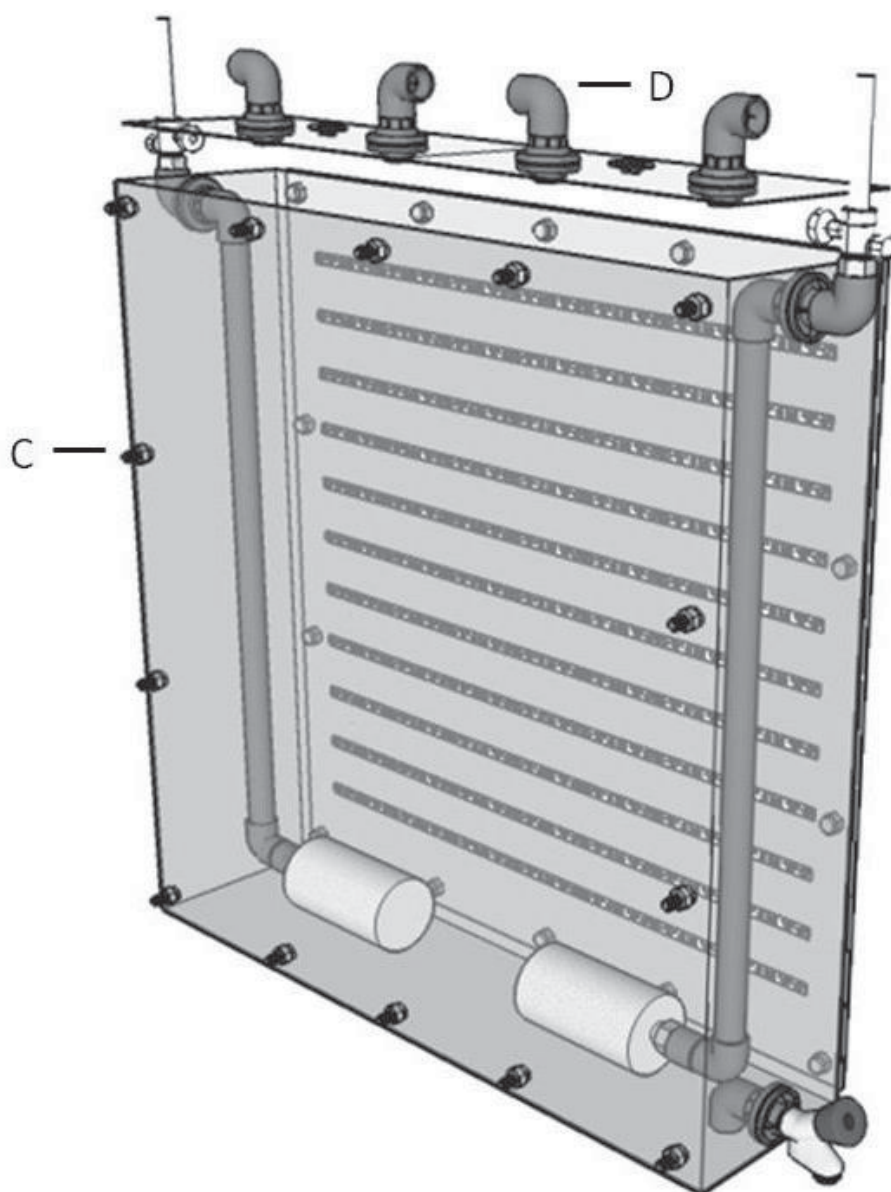
DESENHOS

FIGURA 2 – FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES



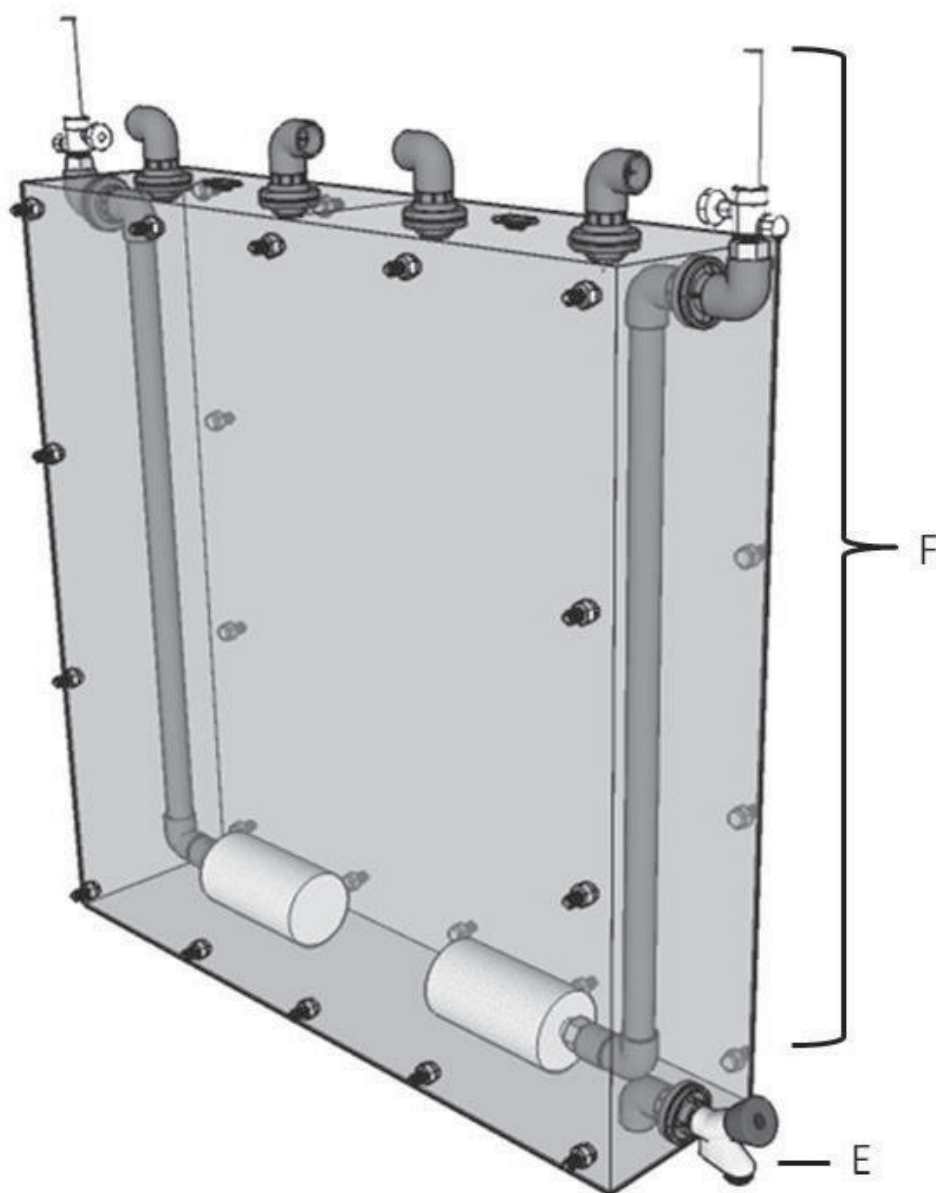
LEGENDA: Destaque para as dimensões da câmara de cultivo (X; Y; Z) e placas de iluminação laterais (A; B).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DO FOTOBIORREATOR SEM UMA DAS PLACAS LATERAIS DE ILUMINAÇÃO



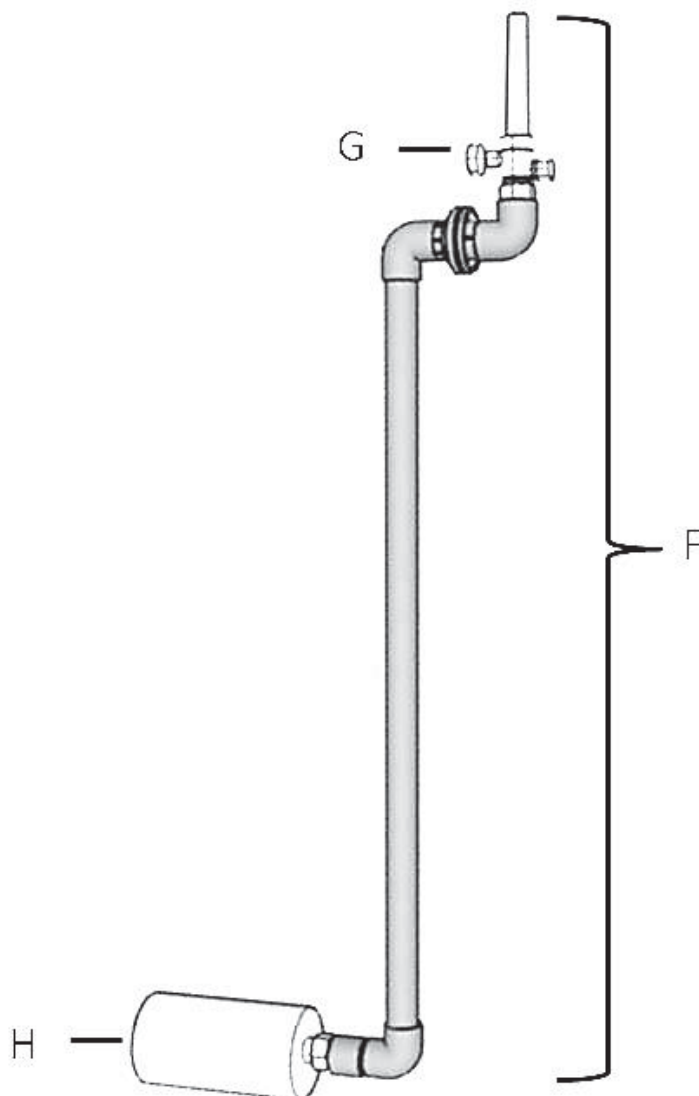
LEGENDA: Destaque para os parafusos de fixação (C) e peças removíveis na face superior com as tubulações para liberação dos gases gerados no interior do fotobiorreator (D)

FIGURA 4 – FOTOBIORREATOR SEM AS PLACAS DE ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL



LEGENDA: Destaque para a válvula para coleta de amostras e recuperação de biomassa localizada na porção inferior (E) e os sistema de areação dispostos de maneira oposta nas extremidades do fotobiorreator (F).

FIGURA 5 – SISTEMA DE AERAÇÃO E INJEÇÃO DE GASES NO INTERIOR DO FOTOBIOREATOR



LEGENDA: Responsável pela homogeneização do meio aquoso (F). Destaque para o regulador de vazão (G) e aspersor de ar (H)

RESUMO

FOTOBIORREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

A presente invenção refere-se a um fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, em especial microalgas marinhas ou dulciaquícolas, em regime batelada, semicontínuo ou contínuo para obtenção de biomassa microalgal e compostos de interesse biotecnológico, bem como fixação de CO₂ presente em emissões diversas e para tratamento de efluentes contendo elevada carga orgânica. O sistema possui estrutura geométrica em forma de hexaedro regular de base retangular construído em material translúcido, iluminação provida por duas placas laterais removíveis compreendendo uma pluralidade de lâmpadas LED e sistema de injeção de ar ou mistura de gases composto por medidores de vazão e aparatos cerâmicos para dispersão dos gases injetados e correta homogeneização do meio, o que dispensa a utilização de bombas ou sistemas auxiliares de circulação. As dimensões do sistema de cultivo possibilitam sua instalação e operação em reduzido espaço, ao mesmo tempo em que permitem seu escalonamento e construção com volume operacional otimizado. Além do crescimento dos micro-organismos, a geometria do fotobiorreator permite realizar a recuperação da biomassa produzida por estratégias de coagulação/floculação *in situ*, dispensando a transferência do volume para outros sistemas.

3 CONCLUSÕES

O desenvolvimento e construção do fotobiorreator resultou em uma ferramenta indispensável para a realização da tese, uma vez que toda a biomassa utilizada nas etapas posteriores foi produzida em seu interior.

A realização de inúmeros cultivos de diferentes espécies de microalgas em regime fotoautotrófico atesta a aplicabilidade do fotobiorreator. O sistema apresenta ainda baixo custo de manutenção, já que tendo transcorridos mais de dois anos de sua construção foram necessárias poucas intervenções corretivas, a maioria delas consistiu de pequenas modificações e melhorias pontuais nos sistemas de iluminação e aeração.

Por essas razões, é possível concluir que a escolha de desenvolver e construir um fotobiorreator como primeira atividade de cunho prático na execução da tese mostrou-se acertada, permitindo inclusive a execução dos experimentos de floculação *in situ* das microalgas com quitosana e a publicação do artigo científico que será apresentado no Capítulo 2.

**CAPÍTULO 2: RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL PRODUZIDA EM
FOTOBIORREATOR POR FLOCULAÇÃO UTILIZANDO QUITOSANA COMO
AGENTE FLOCULANTE**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as etapas de cultivo de microalgas a recuperação da biomassa produzida é uma das mais onerosas em termos energéticos e econômicos, sendo fundamental a constante busca por novas metodologias de separação. Atualmente os principais mecanismos de separação de biomassa empregados são a floculação, a filtração, a flotação, a centrifugação, ou ainda a utilização de duas ou mais técnicas combinadas. De todas essas técnicas, a que apresenta menor custo é a floculação, que consiste na adição de compostos capazes de promover a agregação das células em suspensão, aumentando sua densidade e favorecendo a decantação, com a consequente concentração da biomassa.

Vários agentes químicos têm sido utilizados para essa finalidade, especialmente sais inorgânicos de ferro e alumínio; ou ainda compostos orgânicos poliméricos como os baseados em taninos, amido modificado e a quitosana. As vantagens da utilização de agentes floculantes orgânicos consiste em não ocasionarem a contaminação da biomassa impossibilitando sua utilização e de seus compostos, além de possui um apelo ambiental em função da disposição final dos resíduos gerados no processo.

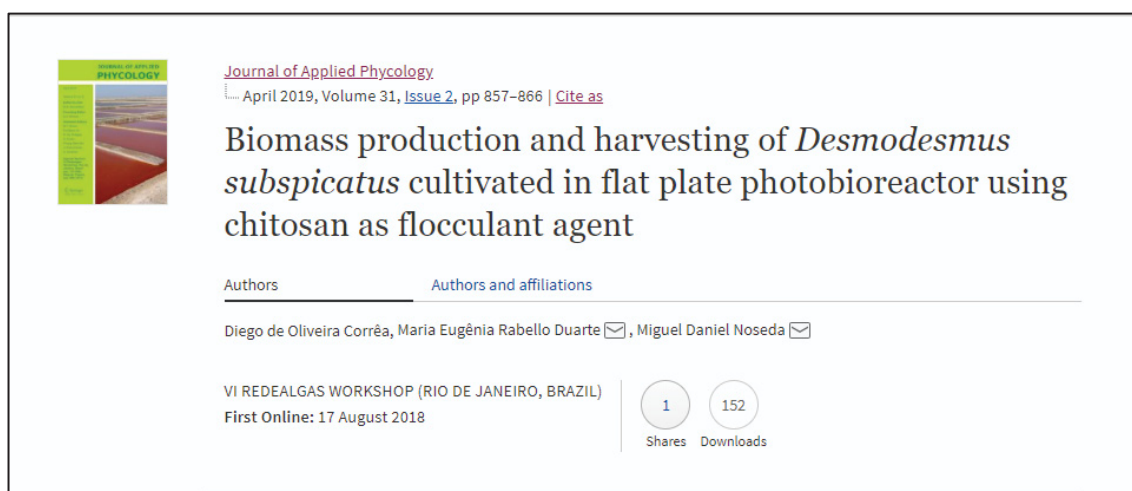
Tendo em vista a necessidade de produção de biomassa microalgal em quantidades capazes de atender as demandas das etapas experimentais do projeto e sua aplicação como bioestimulante em plantas em desenvolvimento, foram realizados ensaios para avaliação de estratégias de recuperação da biomassa por floculação com quitosana. Os resultados obtidos nessa etapa foram compilados em um artigo científico publicado na revista *Journal of Applied Phycology*.

2 ARTIGO: BIOMASS PRODUCTION AND HARVESTING OF *DESMODESMUS SUBSPICATUS* CULTIVATED IN FLAT PLATE PHOTOBIOREACTOR USING CHITOSAN AS FLOCCULANT AGENT

Os resultados da avaliação da floculação da biomassa de microalgas com quitosana foram inicialmente apresentados no VI Redealgas Workshop e posteriormente compilados para publicação.

O artigo apresentado neste capítulo foi publicado na revista *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 2, p. 857-866, 2019 (Figura 6). Por questões relacionadas a seção dos direitos autorais à revista, o artigo será apresentado em sua versão pré-impressão. A versão final do artigo pode ser encontrada no endereço eletrônico: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-018-1586-z>.

FIGURA 6 - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY*



Biomass production and harvesting of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosan as flocculant agent

¹Diego de Oliveira Corrêa, ¹Maria Eugênia Rabello Duarte, ¹Miguel Daniel Nosedá

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail addresses

Diego de Oliveira Corrêa: diego.biodoc@gmail.com

Maria Eugênia Duarte Nosedá: nosedaeu@ufpr.br

Miguel Daniel Nosedá: mdn@ufpr.br +55 41 3361-1579

Abstract

Microalgal biomass production has been investigated since the 1950's by academic and industry sectors due to their biotechnological potential and for biodiesel production. One of the main bottlenecks in microalgae production is biomass recovery and its separation from aqueous medium. For this reason, the use of a flocculation process is an important step to promote microalgae recovery in large scale. In this work we provide a strategy for the harvesting of microalgal biomass using chitosan as flocculating agent in pilot scale cultures performed in flat plate photobioreactor. The results show that chitosan was effective inducing microalgae flocs and separating them by settling. In the jar test scale, the best clarification efficiency was around 99% and when scaled up using a 100 L photobioreactor the biomass recovery efficiency was close to 98%. Comparison of the compositions of biomasses obtained by flocculation and centrifugation indicate no significant differences in terms of carbohydrates, proteins, lipids and ashes, showing that the flocculation process is not affecting the biomass characteristics and its potential biotechnological applications. Based on the presented results, flocculation using chitosan as flocculant agent can be considered as an efficient method to harvest *Desmodesmus subspicatus* biomass cultured in pilot scale photobioreactors.

Keywords: *Microalgae; Flocculation; Chitosan; Zeta Potential; Photobioreactor.*

Introduction

Microalgae present valuable features for bioindustry as their metabolic plasticity, tolerance to environmental changes and potential to be used in genetic engineering. These characteristics make microalgae an important source of high value compounds such as carotenoids, proteins, polyunsaturated fatty acids, polysaccharides and others compounds useful to agriculture and food, pharmaceutical, and chemical industries (Valverde et al. 2016). Microalgae cultures can also be used to promote wastewater treatment and CO₂ fixation from diverse fossil fuel emissions (Correa et al. 2017).

Biomass separation from the liquid medium represents one of the main costs in biomass production and can account for up to 30% of production costs (Hansel et al. 2014). Microalgae cultures are relatively diluted, so large volumes need to be manipulated for biomass recovery (Grima et al. 2003). The technique used to recover microalgae biomass depends on the characteristics of microalgae cells, such as shape and size, crop density, biomass application and costs involved (Brennan and Owende 2010). Essentially, the main techniques used are centrifugation, filtration and sedimentation preceded by flocculation. Various flocculants have been studied in biomass recovery, including inorganic and organic flocculants. Inorganic flocculants commonly include salts of polyvalent cations, such as Al₂ (SO₄)₃, and Fe₂ (SO₄)₃ (Gerde et al. 2014; Chatsungnoen and Chisti 2016). Natural coagulants of vegetable and animal origin, such as tannin, chitosan and cationic starch have been used for water treatment and microalgal biomass recovery (Vadamme et al. 2010; Vieira et al. 2012; Escapa et al. 2017).

Chitosan is a linear polysaccharide composed of randomly distributed β -(1→4)-linked D-glucosamine and N-acetyl-glucosamine obtained from chitin partial deacetylation. Modification of chitin to chitosan alters its properties, so that chitosan is insoluble in water but soluble in most organic acids and some inorganic acids. Due to the large amount of primary amines in its chain, chitosan has several applications in the biomedical area, such as carrier of drugs or genes. Chitosan is also widely used in food, cosmetics and agriculture, and because it is a long-chain polymer and has a high cationic charge density, chitosan can be used as a flocculant agent (Dong; Chen and Liu, 2014). The recovery of the microalgae biomass using chitosan requires low concentration of this polymer and is applicable in cultures of the most variable microalgae species; however, the optimal dosage of chitosan depends on the species used (Heasman et al. 2000). In addition, cell density and pH of the culture may

influence the required concentration of chitosan (Divakaran and Pillai 2002; Şirin et al. 2012; Chen et al. 2013). The addition of chitosan flocculation preceding the final centrifugation step may represent a significant reduction in energy consumption during the biomass recovery process. Xu et al. (2013) achieved a 95% reduction in energy expenditure by adding a chitosan flocculation step in *Chlorella sorokiniana* cultures.

The most of flocculation studies with chitosan focuses on the evaluation of isolated parameters, such as efficiency biomass recovery, flocculant concentration or pH influence. For this reason, the main novelty of the present study is the evaluation of the whole process, from the microalgae culture in photobioreactor to the recovery of the biomass using chitosan, determining the parameters of greatest importance for the process, such as flocculating concentration, flocculation efficiency, zeta potential, floc morphology and macromolecules composition of the recovered biomass. Therefore, the aim of this work was to evaluate the microalgae biomass production of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in a pilot scale flat plate photobioreactor and harvested by *in situ* flocculation using chitosan as flocculant agent. The flocculation efficiency was determined in a jar test scale and in scaled up cultures using a 100 L photobioreactor.

Material and Methods

Flat Plate Photobioreactor

The microalgae culture was carried out in a 100 L flat plate photobioreactor developed in our lab, Patent pending in Brazil (Nosedá et al. 2016). The developed photobioreactor is characterized by its rectangular-shaped regular hexahedron geometric structure, constructed with translucent material, illumination provided by removable side plates with variable-intensity LED lamps, and an air injection system. The photobioreactor construction features allow the biomass recovery by *in situ* flocculation.

Microalgae Culture

The freshwater microalga *Desmodesmus subspicatus* was obtained from the Elizabeth Aida Microalgae Culture Collection of the Fluminense Federal University (Brazil). The algae were photoautotrophically cultivated during 14 days in a 100 L photobioreactor at room-controlled temperature (23 ± 1 °C), without pH system control, under continuous compressed air supply (0.25 vvm without supplementary CO₂),

continuous illumination (24 h) intensity of $155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ using BBM medium (Nichols and Bold 1965), prepared in deionized water containing the following chemicals: NaNO_3 (250 mg L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75 mg L^{-1}), K_2HPO_4 (75 mg L^{-1}), KH_2PO_4 (175 mg L^{-1}), NaCl (25 mg L^{-1}), EDTA (50 mg L^{-1}), KOH (31 mg L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg L^{-1}), H_3BO_3 (11.4 mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($8.8 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1.4 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1.2 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($1.6 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0.49 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$). Parameters such as dry weight adapted from APHA (2005) and pH were daily measured to describe the microalgae growth in culture.

Jar test Flocculation Assays

Fifteen assays (triplicate) were performed with samples collected from the photobioreactor in the culture stationary phase. The samples pH was adjusted to: a) 8.0 (with 1 M HCl); b) 9.0; and c) 10.0 (with 1 M NaOH), to investigate the effect of different pH values and chitosan concentrations. For each assay, 200 mL of culture samples was poured into 250 mL beakers, and the tests were carried out adding chitosan aqueous solution (pK_a 6.5) to obtain final concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 mg of chitosan per liter of culture. Chitosan stock solution (5 g L^{-1}) was prepared before the experiments, dissolving 0.5 g of medium molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich catalog No 448877) in 100 mL of 1% (v/v) aqueous acetic acid. To emulate the flocculation in the photobioreactor, the individual beaker samples were vigorously mixed with air injection for 15 sec, then the chitosan solution was added and gently homogenized for 60 sec to promote flocs formation, and finally, the flocs were left settling during 15 min. After the precipitation time the flocculation efficiency was determined as follows:

$$\text{Efficiency (\%)} = \left(1 - \frac{B_f}{B_i}\right) \times 100$$

Where B_f is the biomass at half of the height of the clarified phase after settling and B_i is the biomass in the fresh culture, before chitosan addition.

After the settling time, the sludge volume was determined to evaluate the flocculation effectiveness in concentrating the microalgal biomass. The concentration factor (CF) was calculated according to Xu et al. (2013), as follows:

$$CF = \left(\frac{(V \times Bi) \times (Vs \times Bs)}{(V - Vs)} \right) / Bi$$

Where V is the total volume of the sample, V_s is the volume of supernatant, Bi is biomass density of the initial sample and Bs is biomass density of the supernatant after flocculation and sedimentation. A higher CF value indicates lower energy consumption for biomass harvesting, considering the centrifugation step after flocculation.

Zeta Potential measurements

To understand the influence of chitosan addition in the cell surface charges and flocculation efficiency, zeta potential (ZP) of the fresh culture and all the flocculated biomasses were determined with Stabino® (Particle Metrix). ZP measurements were carried out with 10 mL of fresh culture cell suspension and with the same volume of all the samples obtained after jar test flocculation assays.

Scanning electron microscopy (SEM)

Microalgae flocculated samples were analyzed by SEM to evaluate the flocs morphology. For this analysis, the flocculated microalgae were fixed in 2.5 % (v/v) glutaraldehyde solution in sodium phosphate buffer (PBS) 1.0 M pH 7.4 for 1 h; after fixation a small aliquot was filtered using polycarbonate membrane (1 µm) and washed for 1 h with PBS; then the flocs samples were dehydrated with increasing concentration ethanol solutions (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 95% v/v) for 10 min each solution (Shubert and Wilk-Wozniak 2003). The cells were submitted to CO₂ critical point to finish the dehydration process, metalized with gold and analyzed by SEM (JEOL mod. JSM-6360 LV).

Photobioreactor biomass recovery

The best flocculation conditions as determined by the jar test assays were reproduced in the 100 L photobioreactor. Chitosan homogenization in the photobioreactor culture was performed by the air injection system. After chitosan addition the culture was vigorously mixed for 30 sec, followed by 5 min of low flow air injection, and finally the air was turn off and the biomass settled for 30 min. Before flocculation a sample was collected directly from the photobioreactor culture and was

centrifuged for 30 min (2,600 x G). Both biomass samples were then freeze dried and stored in freezer for posterior biomass composition analysis.

Biomass composition

Biomass composition of the samples obtained by two different harvesting processes (flocculation and centrifugation) was determined by thermogravimetric analysis using the thermal analyzer STA 449 S3 Jupiter® (Netzsch) with temperature program from 20 to 800 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ (Larrosa et al. 2018). To complement that results were realized colorimetric and gravimetric analysis to determine the major macromolecules in the biomasses. Total carbohydrates were determined by the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al. 1956); proteins using the method described by Lowry et al. (1951); total lipids by the gravimetric method using a mixture of chloroform:methanol (2:1 v/v) as solvent system according to described by Bligh and Dyer (1959).

Statistical methods

All results were obtained from at least three biological replicates, and the results were expressed as mean value ± standard deviation. The biomasses composition was analyzed using Student t test, and statistical significance was set at $P < 0.05$. All graphs were performed using GraphPad Prism 7®.

Results and discussion

The microalga *D. subspicatus* was cultivated in a pilot scale flat plate photobioreactor under photoautotrophic conditions. The growth profile (Fig 7) show that the microalgal biomass increased approximately 12 times from the inoculation of the system until the end of the period, where the concentration of 0.7 ± 0.01 g L⁻¹ was recorded. The growth rate was more accelerate during early four days showing exponential tendency, while during the other 10 days the growth profile was more linear. This may indicate that microalgae multiply more rapidly at the beginning of cultivation, and after that period they begin to gain mass more slowly by the accumulation of energetic reserve molecules. These data are comparable with the one presented by Jiang et al. (2013) that obtained similar results in autotrophic culture of *Scenedesmus dimorphus*, in a 300 mL bubble column photobioreactor; and Mattos et al. (2015) who cultivated *Scenedesmus bijuga* in Erlenmeyer flasks of 4 L and obtained

0.7 g L⁻¹ in different lighting regimes. Although comparable to the literature results, it is worth mentioning the total volume of the photobioreactor used in this work, which results in a higher total amount of biomass produced in the same time interval. The optical path that the light traverses inside the reactor, the two lateral plates with LED illumination and the existence of an aeration system for culture homogenization are the differentials of the photobioreactor used in this work and may explain the high biomass production capacity under photoautotrophic conditions.

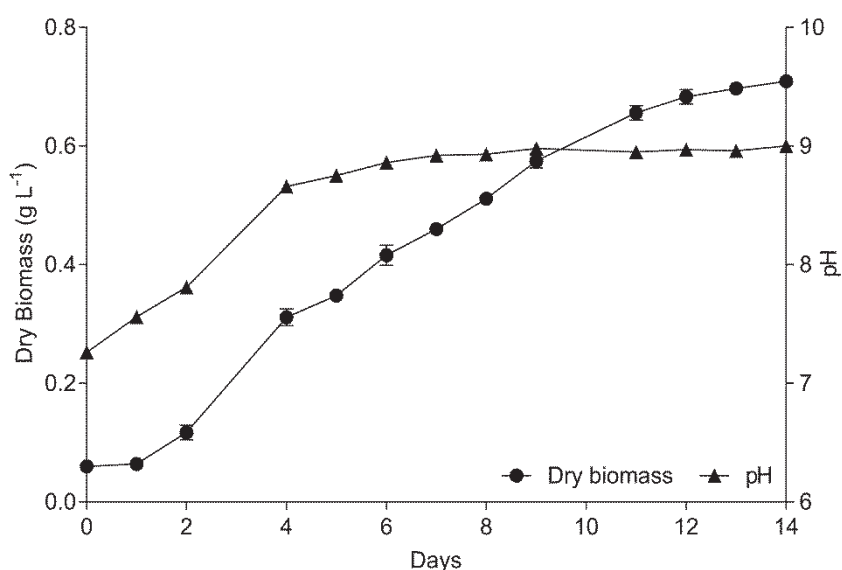


Fig. 7 - Biomass dry weight of *D. subspicatus* and pH profile along 14 days

Another important factor shown in Fig 7 is the pH profile along the time. The cultivation of microalgae begins with pH close to neutrality (7.26 ± 0.02), but from its inoculation the pH increases rapidly until the fourth day of cultivation (8.66 ± 0.03). From that moment the variations become less drastic, reaching the highest pH at the end of the culture period (9.00 ± 0.03). The pH variation is important in the evaluation of the recovery of the biomass obtained by flocculation with chitosan. Therefore, the understanding of the pH behavior throughout the culture is fundamental to determine the flocculation conditions, since the solubility and density of chitosan are strongly influenced by this factor. At neutral and alkaline pH, chitosan can precipitate with co-precipitation of algae (Renault et al. 2009). Although the pH at the end of the culture is alkaline, the addition of chitosan in acetic acid solution decreases the pH of the medium, favoring the protonation of the amino groups in its structure, making the

polymer capable of interacting with the negative charges on the microalgae surface, increasing flocculation efficiency.

At the end of the culture period, aliquots of the photobioreactor were collected to evaluate the flocculation efficiency using chitosan at different concentrations and pH values, to determine the best biomass recovery conditions and to carry out the process scaling up for the total volume of photobioreactor. For this reason, three pH values (8, 9, and 10) as well as five concentrations of chitosan (10; 20; 30; 40; and 50 mg L⁻¹) were evaluated in experiments similar to the Jar test methodology. The objective of the choice of the pH range was to reproduce the values usually found in previously photobioreactor cultures and to make the analysis closer to the reality of biomass production. For the jar tests at pH 8 the higher flocculation efficiency (97.64 ± 0.14%) corresponds to the lower concentration of chitosan used (10 mg L⁻¹); for the tests performed at pH 9 the highest biomass recovery efficiency was recorded using 20 mg L⁻¹ of chitosan; whereas for the pH 10 tests, the highest efficiency was related to the use of 40 mg L⁻¹ (Fig 8). The need for addition of higher amounts of chitosan in the tests at higher pH is a consequence of the structural characteristics of this polymer as its deprotonation constant. Chitosan tends to present higher densities of positive charges at more acidic pH (Renault et al. 2009). Thus, the more alkaline the initial pH of the samples, the greater the amount of chitosan needed to neutralize the negative charges present on the surface of the microalgae cells. This dose-dependent effect presents a balance that involves the amount of positive charges present in the polymer, the pH of the medium and its influence on the ionization of the chitosan amino groups, and the density of negative charges resulting from the concentration of biomass present in the system. Studies using chitosan as a flocculating agent to recover biomass of *Scenedesmus* sp. showed results of flocculation efficiency in the order of 97.4% at pH 11.5 (Chen et al. 2013); while Ahmad et al. (2011) observed an efficiency higher than 99.0% for *Chlorella* sp. with 20 µg mL⁻¹ of chitosan. These results reinforce the reproducibility and viability of the use of chitosan as a flocculating agent in the recovery of microalgae biomass.

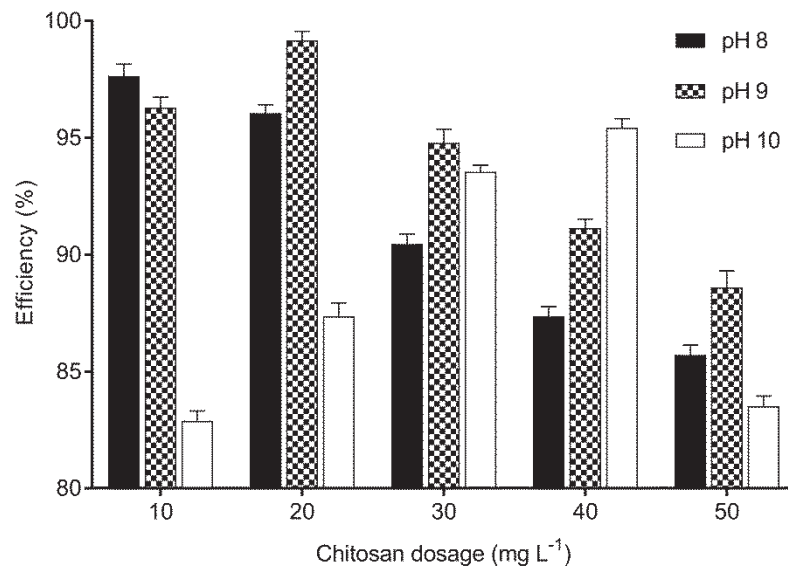


Fig. 8 - Jar test experiments varying chitosan dosage and pH

The zeta potential, another parameter frequently used to study the flocculation process, is defined as a measure of the electric potential in the double layer at the interface of the particles and is dependent on the surface charge of the particles and the nature and composition of the surrounding medium in which they are suspended (Atkins 1990). Fig 9 shows the results of the zeta potential measurements performed on the flocculated fractions of each jar test experiment. The zeta potential of the culture without addition of the flocculating agent was -23.11 ± 0.27 mV, like that observed by Selesu et al. (2016), which registered a value of -26.30 ± 1.55 mV for *Scenedesmus* sp. cultivated under similar conditions and close to the value observed by Lama et al. (2016), with -24 ± 1.0 mV for *S. obliquus*. The observation of negative zeta potential values is related to the negative surface charge of the suspended microalgae cells and for most species it is between -10 and -35 mV.

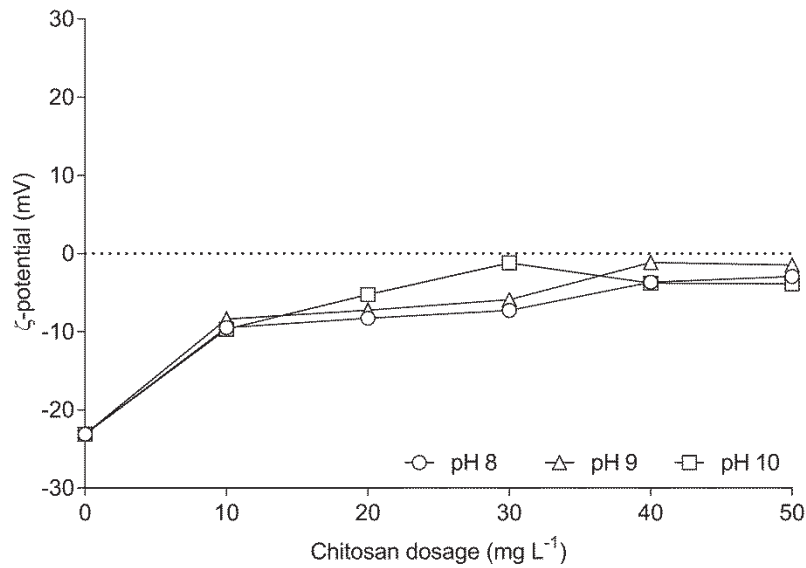


Fig. 9 - Zeta (ζ -) potential of flocculated biomass in the jar test bioassays

For the tests carried out at pH 8, the zeta potential of the samples varied from -9.47 ± 0.13 mV in the lowest concentration of chitosan up to -2.92 ± 0.10 mV in the highest flocculant concentration; for the tests at pH 9, the zeta potential values ranged from -8.37 ± 0.10 mV up to -1.47 ± 0.59 mV; while for the assays at pH 10 the results ranged from -9.67 ± 0.33 mV up to -1.21 ± 0.02 mV. Although the zeta potential values do not show a direct correlation with the flocculation efficiency results, all the values recorded show a tendency to load neutrality due to the addition of positively charged chitosan. Similar results were obtained by Gerchman et al. (2017) in flocculation assays using chitosan at different concentrations to flocculate *Chlorella vulgaris*. Differently to what was initially expected, the observed zeta potential values do not reflect the complete neutrality of surface charges, even though they present high biomass recovery efficiency results. In our results, this effect may be related to the chemical nature of the culture medium, since the experiments showed in the present work were performed with aliquots taken directly from the photobioreactor culture after 14 days of cultivation, and may contain cell debris, secondary metabolites and other compounds produced by algae.

Together with the results of biomass recovery, efficiency and zeta potential, the concentration factor (CF) was calculated for each sample, in order to determine the effectiveness of concentrating the suspended biomass in the smallest possible volume, thus reducing the energy demand for the harvesting at the end of the growing period. In summary, the concentration factor correlates the flocculation efficiency with the

volume generated by the precipitate at the end of the sedimentation period. Table 1 summarizes all the results obtained in the tests performed in jar scale. Similarly to the results of flocculation efficiency, the highest CF was recorded for the assay performed at pH 9 with the addition of 20 mg L⁻¹ of chitosan showing a value of 79.33 ± 0.08.

Table 1 - Biomass recovery and concentration factor in the jar test bioassays

Parameters	Initial pH	Chitosan concentration (mg L ⁻¹)				
		10	20	30	40	50
Biomass recovery (g L ⁻¹)	8	6.92±0.09	6.81±0.17	5.13±0.13	4.95±0.09	4.86±0.12
	9	6.83±0.18	7.03±0.11	6.72±0.20	6.46±0.16	6.28±0.15
	10	5.88±0.21	6.19±0.09	6.63±0.14	6.77±0.12	5.92±0.19
Concentration factor	8	55.82±0.06	42.45±0.07	32.23±0.16	15.94±0.11	10.75±0.08
	9	62.68±0.09	79.33±0.08	23.71±0.14	13.73±0.05	9.14±0.26
	10	12.79±0.04	16.75±0.14	24.97±0.08	42.45±0.12	11.87±0.06

Means with standard deviation (n = 3)

With the results obtained in the jar test scale it was possible to evaluate the biomass recovery conditions in the photobioreactor. Since the pH found at the end of the microalgae cultivation is pH 9 (see Fig 7) and the best flocculation result for this pH in the jar tests was observed with chitosan at 20 mg L⁻¹ (see Tab 1), we decided to choose this concentration to perform the flocculation scale up in a 100 L photobioreactor. Using the that conditions, the flocculation efficiency in the photobioreactor reached 98.7% with a concentration factor of 69.55 and biomass recovery of 7.0 g L⁻¹. These results indicate a great efficiency in the flocculation carried out using a 100 L photobioreactor, as the pilot scale process allowed a biomass recovery with few losses when compared with the jar test scale. The geometry and construction characteristics of the photobioreactor allowed the *in situ* biomass recovery, which avoids the need of volumes transfer to additional systems, such as settling tanks, thus reducing the associated biomass losses. After addition of the flocculating agent, homogenization of the cells in suspension and precipitation, the biomass is deposited in the lower portion of the reactor, available for harvesting through a register that allows the complete flow of the material.

To compare the characteristics of the biomasses recovered by centrifugation and flocculation, scanning electron microscopy (SEM) analyzes were performed (Fig

10). In culture the microalgae present isolated cells or colonial growth usually with 4 cells arranged parallel to the longitudinal axis and with elongated spines at their ends (Fig 10a,b). After flocculation, the microalgae present the appearance of cellular and colonial agglomerates bound together by a network of interactions resulting from the action of chitosan, along with the aggregation of culture medium salts and dead cell fragments (Fig 10c,d).

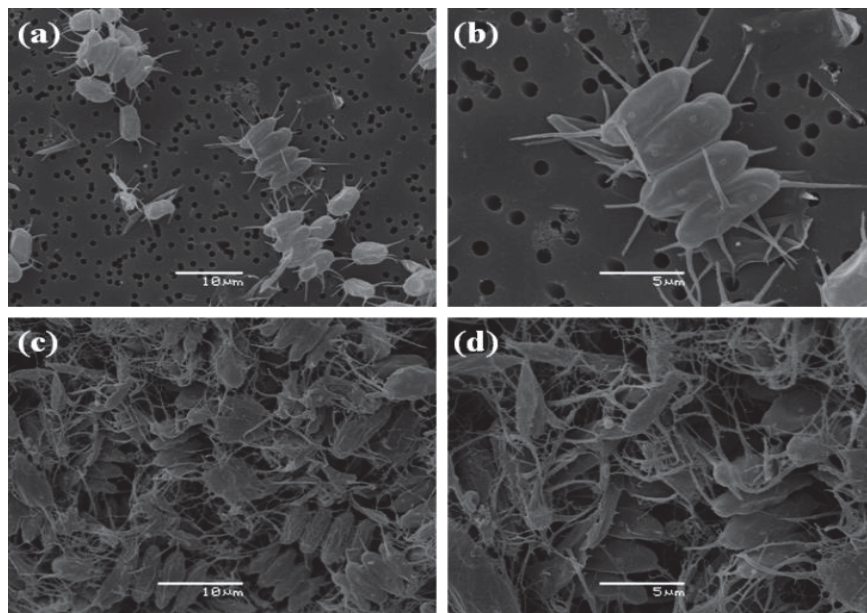


Fig. 10 - Scanning electron microscopy of fresh culture (a,b) and flocculated biomass (c,d)

This aggregation pattern can be explained by the interactions between the chitosan polymer and cells surface, and different flocculation mechanisms were proposed such as simple charge neutralization, charge patching, bridging, and sweeping. It is possible that more than one flocculation mechanism occurs simultaneously, and this depends on the characteristics of particles in suspension and the chemical properties of flocculant (Yang et al. 2016). For chitosan polymer, the positively charges bind partly to microalgal cells and the unoccupied part of the polymer binds to other cells, thereby bridging them and resulting in a network of polymers and microalgal cells (Salim et al. 2011). Based in the SEM analysis we suggest that bridging is the mechanism responsible to the floc formation in the microalgae cultivated in photobioreactor flocculation using chitosan (Fig 11).

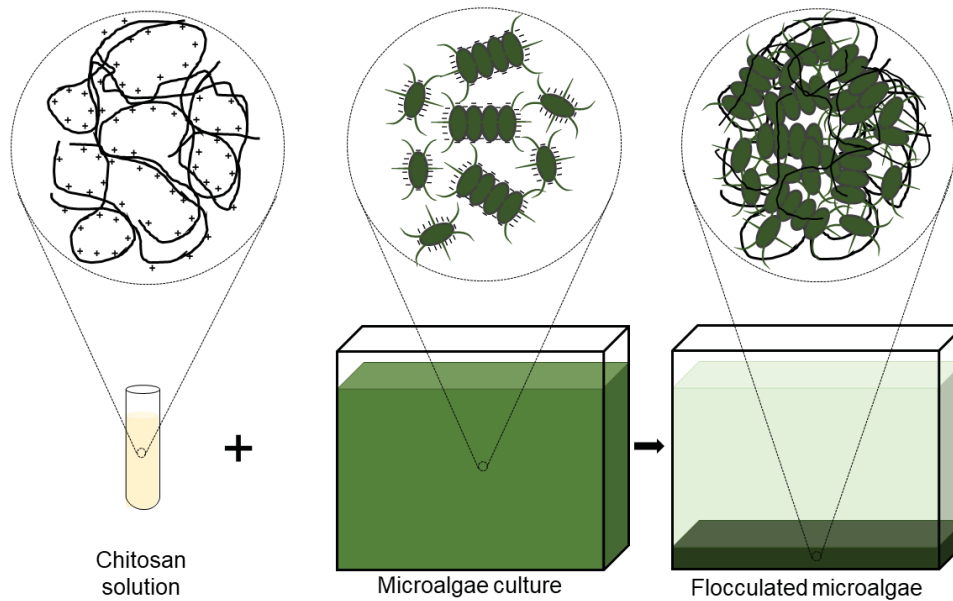


Fig. 11 - Schematic view of flocculation bridging mechanism in photobioreactor microalgae culture

In addition to the morphological analysis using SEM, biomasses recovered by centrifugation and flocculation were evaluated for their chemical composition. Thermogravimetric analysis is a methodology in which the weight of the samples is determined continuously during a continuous and controlled heating process. The correlation between the sample weight and temperature changes allows the physical and chemical properties of the samples to be described through the TG and DTG curves (Bach and Chen 2017). In summary, TG shows the mass loss of the samples, while DTG indicates the temperature ranges between which the mass loss events are characterized. The results show great similarity between the thermal decomposition pattern of flocculated and centrifugated biomasses (Fig12). DTG curves indicates three different stages in decomposition process (Fig 12a,b). Stage 1, with a temperature range from 20 to 135 °C is characterized by slight weigh loss due to the moisture present in the samples. The main mass loss occurred during stage 2, with temperature range from 135 to 500 °C, where most of the organic compounds, such as carbohydrates, proteins and lipids were lost. In stage 3, with temperature between 500 and 800 °C the composition of other carbonaceous matters contributes to slight weigh loss as show in TG curves (Wu et al. 2014).

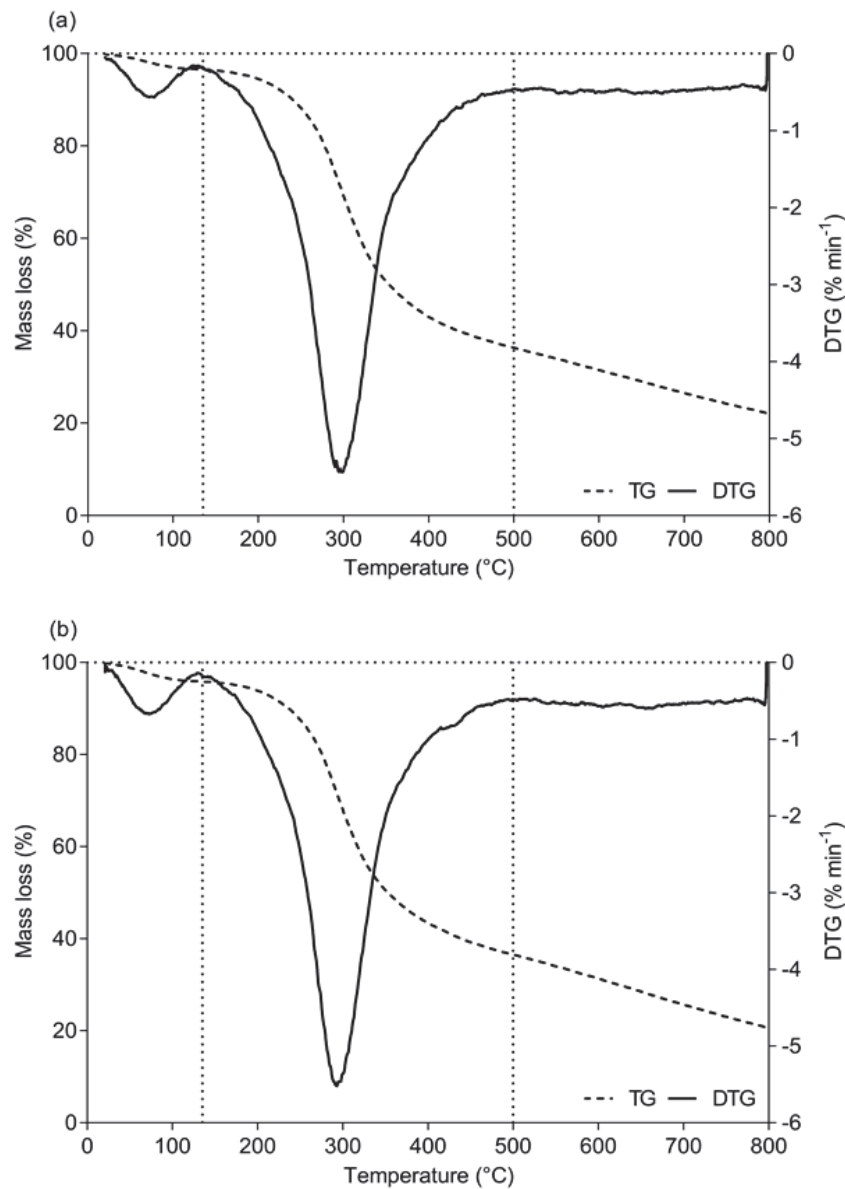


Fig. 12 - TG and DTG curves of the biomass flocculated (a) and centrifuged (b)

Based on the mass degradation during the thermogravimetric analysis we calculate the composition for flocculated and centrifuged biomass (Table 2). The moisture of the samples was 4.2 and 3.5% for flocculated and centrifuged biomass, respectively. For the main organic compounds composition (here described by the total of carbohydrates, proteins and lipids) the content was 59.3% for flocculated biomass and 60.2% for centrifuged. These values represent a variation coefficient of 1.1% and indicates low differences between samples composition. The content of other carbonaceous compounds was 14.8% for flocculated and 14.2% for centrifuged biomass, which represents 2.9% of variation coefficient. The content of ashes and fixed carbon for flocculated biomass was 21.7%, while for centrifuged was 22.1%, with

variation of 1.3%. These results indicate that have no great differences between the biomasses recovered by flocculation and centrifugation and show that chitosan does not interfere on the biomass main composition.

Table 2 - Composition of centrifuged and flocculated biomasses by thermogravimetric analysis

Composition (%)	Biomass	
	Flocculated	Centrifuged
Moisture	4.2	3.5
Organic compounds (CHO, PTN, LPD)	59.3	60.2
Other carbonaceous	14.8	14.2
Ashes and fixed carbon	21.7	22.1

CHO = Carbohydrates; PTN =Proteins; LPD = Lipids

To corroborate and complement the thermogravimetric analysis, the carbohydrate, proteins and lipid contents were analyzed in both biomass lots by colorimetric and gravimetric methods (Fig 13). The results indicate the presence of approximately 33% of carbohydrates present in the flocculated biomass and about 31% for the centrifuged biomass. Proteins presented values of 11% for both centrifuged and flocculated lots. Similarly, the lipids presented the same content of 16% for the both biomasses. The sum of carbohydrates, proteins and lipids contents represents the total organic compounds present on the biomass and the comparison of these results with those obtained from thermogravimetric analysis indicates that the flocculation with chitosan do not interfere or modify the biomass composition. The stability in the composition of the biomass centrifuged and flocculated corroborates the data of Gupta et al. (2018), who evaluated the lipid extraction of *Scenedesmus* sp. to produce biodiesel in microalgae flocculated with chitosan and aluminum salts. They reported the maintenance of lipid contents after the use of chitosan, unlike the results observed when aluminum salts were used as flocculant agent.

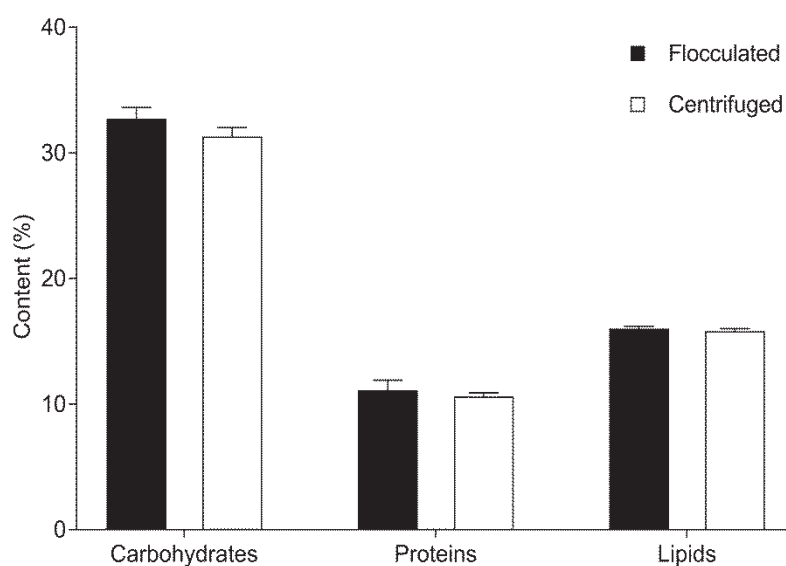


Fig. 13 - Carbohydrates (CHO), proteins (PTN) and lipids (LPD) content in the biomasses by colorimetric and gravimetric analysis

Evaluating the influence of chitosan on biomass composition is fundamental to define the use of biomass and its compounds. Ideally, flocculating agents should not modify the biomass composition of microalgae or alter the physicochemical properties of their constituents. Chitosan does not interfere in the metabolites extraction from microalgal biomass unlike the use of metals like aluminum sulfate that cause a significant loss of microalgae metabolite contents, which could be attributed to the metal contaminations in biomass (Chatsungnoen and Chisti (2016)). According Gutiérrez et al. (2015) the presence of chemicals coagulants as aluminum or iron salts can consume alkalinity and reduce pH providing a negative impact on subsequent biomass reuse to production feed supplement for animals and aquatic organisms or biofuels production.

Conclusion

The present study allowed obtaining an overview of the cultivation of the microalga *Desmodesmus subspicatus* in photobioreactor, evaluating one of the main bottlenecks in this process, the biomass recovery. The use of chitosan for biomass flocculation made possible the scale up of the production process with a 100 L photobioreactor. The results indicate the feasibility of the use of this polymer since in addition to the high efficiency in biomass recovery it did not affect the microalgae composition, allowing its use in purposes that can range from the pharmaceutical

industry to food supplementation. Thus, the use of chitosan to recover the biomass of *D. subspicatus* via flocculation is a functional alternative that enables the biomass production of this microalga.

Acknowledgments

This work was financed by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, Brazil (projects nº 403869/2013-7 and 462414/2014-0). DOC acknowledges CNPq for a doctoral fellowship. The authors wish to acknowledge the Elizabeth Aida Microalgae Culture Collection of the Fluminense Federal University (UFF) for the kindly supply of the microalgae used in this work. In addition, we are grateful to the Electron Microscopy Center of the Paraná Federal University (CME-UFPR) for the SEM analyses.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahmad AL, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK (2011) Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chem Eng J* 173:879-882
- APHA (2005) Standard methods for the examination of water and waste water, 21st edn. American Public Health Association, Washington
- Atkins PW (1990) Physical Chemistry. WH Freeman and Company, New York
- Bach Q-V, Chen W-H (2017) Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review. *Bioseour Technol* 246:88-100
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev* 14:557-577
- Chatsungnoen T, Chisti Y (2016) Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. *J Appl Phycol* 28:2697-2705

- Chen L, Wang C, Wang W, Wei J (2013) Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresour Technol* 133:9-15
- Correa DO, Santos B, Dias FG, Vargas JVC, Mariano AB, Balmant W, Rosa MP, Savi DC, Kava V, Glienke C, Ordonez JC (2017) Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation. *Int J Hydrog Energy* 42:21463-21475
- Divakaran R, Pillai VNS (2002) Flocculation of algae using chitosan. *J Appl Phycol* 14:419-422
- Dong C, Chen W, Liu C (2014) Flocculation of algal cells by amphoteric chitosan based flocculant. *Bioresour Technol* 170:239-247
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Escapa C, Coimbra RN, Paniagua S, García AI, Otero M (2017) Comparison of the culture and harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Tetradesmus obliquus* for the removal of pharmaceuticals from water. *J Appl Phycol* 29:1179-1193
- Gerchman Y, Vasker B, Tavasi M, Mishael Y, Kinel-Tahan Y, Yehoshuan Y (2017) Effective harvesting of microalgae: Comparison of different polymeric flocculants. *Bioresour Technol* 228:141-146
- Gerde JA, Yao L, Lio JY, Wen Z, Wang T (2014) Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. *Algal Res* 3:30-35
- Grima EM, Belarbi EH, Fernández FGA, Medina AR, Chisti Y (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol Adv* 20:491-515
- Gupta SK, Kuma NM, Guldhe A, Ansari FA, Rawat I, Nasr M, Bux F (2018) Wastewater to biofuels: Comprehensive evaluation of various flocculants on biochemical composition and yield of microalgae. *Ecol Eng* 117:62-68
- Gutiérrez R, Ferre, I, García J, Uggetti E (2015). Influence of starch on microalgal biomass recovery, settleability and biogas production. *Bioresour Technol* 185:341-345

- Hansel PA, Riefler RG, Stuart BJ (2014) Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. *Algal Res* 5:133-139
- Heasman M, Diemar J, O'Connor W, Sushames T, Foulkles L (2000) Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks - a summary. *Aquac Res* 31:637-659
- Jiang Y, Zhang W, Wang J, Chen Y, Shen S, Liu T (2013) Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour Technol* 128:359-364
- Lama S, Muylaert K, Karki TB, Foubert I, Henderson RK, Vandamme D (2016) Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresour Technol* 220:464-470
- Larrosa APQ, Camara AS, Pohndorf RS, Rocha SF, Pinto LAA (2018) Physicochemical, biochemical, and thermal properties of *Arthrospira (Spirulina)* biomass dried in spouted bed at different conditions. *J Appl Phycol* 30:1019-1029
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Mattos ER, Singh M, Cabrera ML, Das KC (2015) Enhancement of biomass production in *Scenedesmus bijuga* high-density culture using weakly absorbed green light. *Biomass and Bioenergy* 81:473-478
- Nichols HW, Bold HC (1965) *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *J. Phycol.* 1:34-38
- Noseda MD, Correa, DO, Noseda MED, Oliveira AC, Dominiz, BSN, Rodrigues, JM Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. INPI patent BR1020160294851, December 15, 2016
- Renault F, Sancey B, Badot PM, Crini G (2009) Chitosan for coagulation/flocculation processes - an eco-friendly approach. *Eur Polym J* 45:1337-1348
- Salim S, Bosma R, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J Appl Phycol* 23:849-855
- Shubert LE, Wilk-Wozniak E (2003) SEM investigation of several non-motile coccoid green algae isolated from aquatic habitats in Poland. *Biologia, Bratislava* 58:459-466

- Selesu NFH, de Oliveira TV, Correa DO, Miyawaki B, Mariano AB, Vargas JVC, Vieira RB (2016) Maximum Microalgae Biomass Harvesting via Flocculation in Large Scale Photobioreactor Cultivation. *Can J Chem Eng* 94:304-309
- Şirin S, Trobajo R, Ibanez C, Salvadó J (2012) Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *J Appl Phycol* 24:1067-1080
- Valverde F, Romero-Campero FJ, León R, Guerrero MG, Serrano A (2016) New Challenges in Microalgae Biotechnology. *Eur J Protistol* 55:95-101
- Vandamme D, Foubert I, Meesschaert B, Muylaert K (2010) Flocculation of microalgae using cationic starch. *J Appl Phycol* 22:525-530
- Vieira RB, Vieira PA, Cardoso SL, Ribeiro EJ, Cardoso VL (2012) Sedimentation of mixed cultures using natural coagulants for the treatment of effluents generated in terrestrial fuel distribution terminals. *J Hazard Mater* 231-232:98-104
- Wu K, Liu J, Wu Y, Chen Y, Li Q, Xiao X, Yang M (2014) Pyrolysis characteristics and kinetics of aquatic biomass using thermogravimetric analyzer. *Bioresour Technol* 163:18-25
- Xu Y, Purton S, Baganz F (2013) Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour Technol* 129:296-301
- Yang R, Li H, Huang M, Yang H, Li A (2016) A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water Res* 95:59-89

3 CONCLUSÕES

A utilização da quitosana como agente floculante reuniu a vantagem de ser um polímero orgânico que não compromete a posterior utilização da biomassa com a baixa dosagem requerida para máxima recuperação da biomassa. As análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram inferir o mecanismo de ação pelo qual a quitosana se liga à superfície das microalgas e indicaram a formação de uma rede tridimensional formada pela interação entre as cargas positivas do polímero e as cargas negativas presentes na superfície das algas.

A avaliação da recuperação da biomassa produzida no fotobiorreator por estratégias de floculação foi indispensável para a sequência das atividades em função do volume operacional do sistema de cultivo, o que permitiu a obtenção da biomassa necessária para os bioensaios de atividade bioestimulante.

**CAPÍTULO 3: ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL DO EXTRATO AQUOSO
DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E SUAS FRACÇÕES**

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda pela produção de alimentos associada à necessidade de desenvolvimento de práticas de agricultura mais sustentáveis tem ocasionado a busca por novas metodologias de produção vegetal que reduzam a utilização de fertilizantes químicos, agrotóxicos e pesticidas.

A biomassa de microalgas possui inúmeras aplicações biotecnológicas, dentre as quais é possível destacar a atividade bioestimulante vegetal. A aplicabilidade das microalgas para essa finalidade é tradicionalmente associada à presença de fitormônios e outras moléculas reguladoras do crescimento vegetal presentes na biomassa, entretanto, a complexidade bioquímica das microalgas e seus produtos derivados pode favorecer o crescimento das plantas de maneiras diversas.

Tendo em vista o potencial bioestimulante vegetal da biomassa de microalgas e seus compostos, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus* em diferentes etapas do desenvolvimento de plantas de alface, juntamente como a realização de bioensaios com cotilédones de pepino e a determinação de sua composição química, uma vez que se acredita que os diferentes compostos presentes na biomassa possuem atividade sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um dos maiores desafios contemporâneos da humanidade consiste no equilíbrio entre o desenvolvimento de novas tecnologias e a conservação ambiental sem a sobre-exploração dos recursos naturais, o que coloca a agricultura no centro dessa discussão. Projeções da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura estimam que até o ano de 2050 a produção de alimentos precisará aumentar em cerca de 70% para atender a uma população mundial estimada em mais de 9 bilhões de pessoas (FAO, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias de produção agrícola sustentável tem se mostrado como uma ferramenta de grande relevância. Técnicas alternativas como o uso de substâncias que atuem na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal têm resultado no aumento da produtividade e melhoria da qualidade em diversos cultivos (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Os fertilizantes sintéticos usualmente utilizados na produção agrícola são derivados de fontes não renováveis e seu uso está associado a problemas ambientais como a infertilidade, acidificação e aumento da salinidade dos solos; geração de gases do efeito estufa; e a eutrofização de recursos hídricos devido sua composição apresentar grandes quantidades de nitrogênio, fósforo e potássio (IBGE, 2015; UDVARDI et al., 2015; CHEN et al., 2017). Além desse fator, o risco de contaminação por compostos químicos é uma preocupação para os consumidores, especialmente no que diz respeito ao consumo de vegetais frescos. Tecnologias alternativas como o uso de produtos naturais com efeitos de crescimento de plantas precisam ser priorizadas como forma de aumentar a produtividade em sistemas agrícolas sustentáveis (MÓGOR et al., 2018).

O uso de compostos de origem natural é uma prática crescente na agricultura moderna e vem sendo considerado uma alternativa rentável e sustentável ao uso de fertilizantes sintéticos. Sua utilização tem por objetivo melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade das culturas, bem como diminuir a poluição e os impactos ambientais associados ao uso de fertilizantes sintéticos (SPINELLI et al., 2009; MORAES, 2015; SCAGLIA et al., 2017). A utilização de compostos orgânicos com atividade bioestimulante vegetal tem ganhado cada vez mais espaço nesse cenário de agricultura orgânica, embora sua definição ainda seja alvo de discussão na comunidade científica. De acordo com du Jardin (2015), os bioestimulantes podem ser definidos como substâncias ou micro-organismos que produzem o aumento da eficiência nutricional, tolerância ao estresse abiótico, e melhoram as características de qualidade das culturas alvo, independentemente de seu conteúdo nutricional.

Compostos com atividade bioestimulante podem ser aplicadas diretamente nas plantas (folhas ou frutos) ou em sementes, e apresentam capacidade de promover ou modificar os processos morfológicos e fisiológicos a fim de aumentar a produtividade dos cultivos em diferentes estágios de desenvolvimento (CASTRO, 2006; MORAES, 2015). O uso de bioestimulantes pode levar a uma maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos nas plantas; aumentar a assimilação de nutrientes e minerais; melhorar a resistência a patógenos; e maximizar o crescimento das raízes e brotos, melhorando o crescimento, qualidade e produtividade da planta (CALVO et al., 2014; SCAGLIA et al., 2017).

Diversos produtos de origem vegetal têm sido comercializados como biofertilizantes e bioestimulantes agrícolas (POVH, 2008; CARVALHO, 2014;

BATTACHARYYA et al., 2015). Esses produtos possuem diferentes variações em sua composição e podem ser compostos por reguladores vegetais; aminoácidos e peptídeos derivados de hidrolisados proteicos; macro e micronutrientes; vitaminas; substâncias húmicas; extratos de macro e microalgas; e inoculantes com microrganismos. (CASTRO, 2006; CALVO, et al., 2014; CANELLAS et al., 2015; COLLA et al., 2015; MORAES, 2015). Entre os produtos comercializados como bioestimulantes de eficácia comprovada destaca-se o uso de extratos de macroalgas, em sua maioria derivados da espécie *Ascophyllum nodosum* (SAA et al., 2015). De modo geral, os extratos de macroalgas são constituídos de macro e micronutrientes, aminoácidos, oligossacarídeos e hormônios vegetais, especificamente por citocininas, auxinas, ácido abscísico e giberelinas (RIOUX et al., 2007; TARAKHOVSKAYA et al., 2007; CRAIGIE, 2011; COLLA et al., 2015; RENGASAMY et al., 2016). Esses compostos podem interagir de forma sinérgica e aumentar o crescimento das plantas em cultivo. Apesar de sua potencial aplicação como fonte de moléculas com atividade bioestimulante, o uso das macroalgas esbarra na dificuldade da manutenção da disponibilidade de matéria-prima para sua fabricação, uma vez que a obtenção das macroalgas ocorre diretamente da natureza, o que pode ocasionar potenciais impactos ambientais decorrentes da sobre-exploração desses organismos e causar alterações nas dinâmicas ecológicas naturais (CRAIGIE, 2011; SEELEY; SCHLESINGER, 2012; HALAT et al., 2015).

Para resolver essa problemática ambiental, as microalgas têm sido propostas como uma fonte alternativa e quase ilimitada na busca de novos compostos bioativos de interesses diversos. As vantagens da sua utilização estão associadas a possibilidade de serem cultivadas em condições controladas e sua capacidade de produzir metabólitos diferentes em função de condições de cultivo (PLAZA et al., 2009; ZHANG et al., 2015; ZHAN et al., 2017).

A atividade bioestimulante das microalgas é associada à presença de diferentes substâncias como aminoácidos e peptídeos (JIE et al., 2008; RAMOS-SUÁREZ et al., 2014); proteínas, polissacarídeos, vitaminas e minerais (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; CHEW et al., 2017); e especialmente à presença de diferentes classes de fitormônios (LU; XU, 2015). Embora os processos de biossíntese e ação dos fitormônios e outros reguladores vegetais sejam muito bem descritos na literatura (SANTNER et al., 2009), nas microalgas o seu papel fisiológico, efeitos endógenos e vias metabólicas ainda não são bem conhecidos (BAJGUZ, 2009;

TARAKHOVSKAYA et al., 2007; STIRK; VAN STADEN, 2010; LU et al., 2014; LU; XU, 2015).

No que diz respeito à aplicação comercial desses compostos derivados de microalgas, atualmente existem alguns produtos disponíveis, caracterizados por conter elevados teores de aminoácidos livres; polissacarídeos; antioxidantes; fitohormônios e oligoelementos (ALGA ENERGY, 2018; ALLGROW, 2018; BIORIZON, 2018). No entanto, cabe destacar a ausência de quaisquer produtos bioestimulantes comerciais de fabricação nacional, o que demonstra a existência de um nicho biotecnológico expressivo a ser explorado.

Apesar da atividade bioestimulante vegetal observada para diferentes microalgas e da existência de produtos comerciais com essa finalidade, a literatura científica ainda necessita de maiores evidências experimentais dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na ação das diferentes moléculas sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrações aquosas sequenciais da microalga

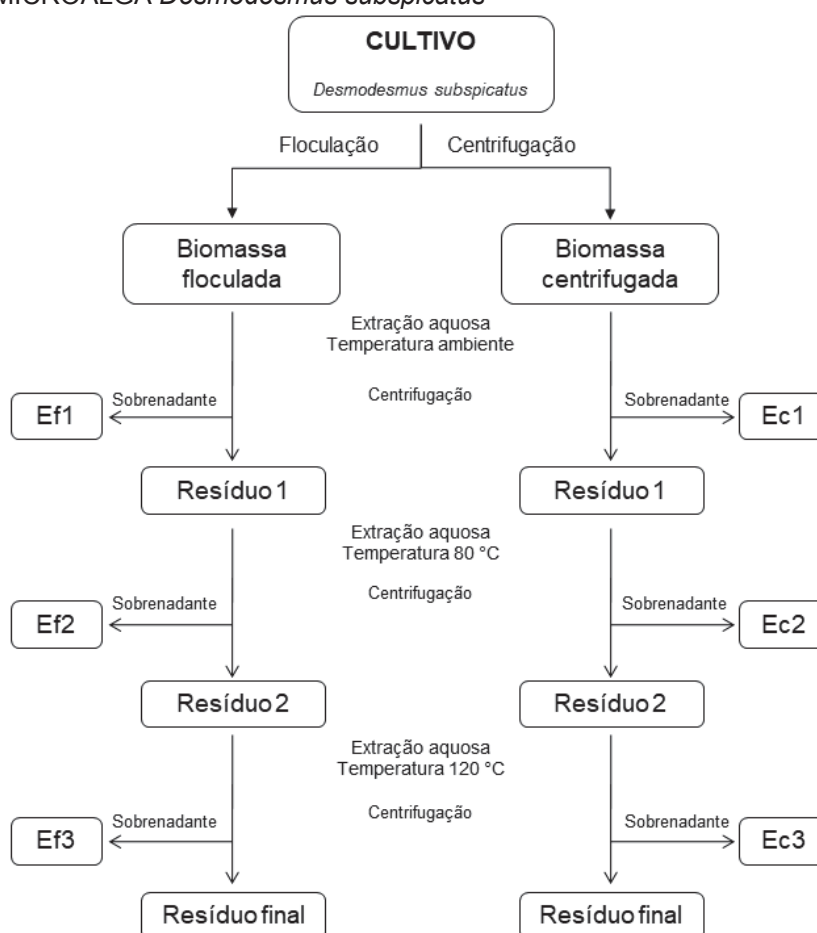
A biomassa de *Desmodesmus subspicatus* produzida em fotobiorreator (ver apêndice 1) foi recuperada por duas estratégias diferentes: Floculação com quitosana e somente por centrifugação, a fim de avaliar se a adição de um polímero orgânico como agente floculante poderia alterar a composição dos extratos obtidos da biomassa. Os diferentes lotes de biomassa seca (floculada e centrifugada) foram submetidos a extrações aquosas sequenciais, nas quais a biomassa residual de uma etapa serviu de material para extração na etapa seguinte. A primeira etapa consistiu em uma extração aquosa realizada em temperatura ambiente utilizando água ultrapura a 10% (m v⁻¹) como solvente, sob agitação mecânica por 2 h. Após a extração, a biomassa foi centrifugada a 2.600 x g por 20 min a 4 °C, gerando os extratos Ef1 e Ec1. A biomassa residual foi então utilizada para a segunda etapa de extração, repetindo as condições, mas alterando a temperatura para 80 °C, gerando assim os extratos Ef2 e Ec2. Por fim, a biomassa residual da segunda extração foi utilizada na etapa seguinte para extração em 120 °C em autoclave por 1 h, gerando os extratos Ef3 e Ec3. A Figura 14 ilustra as extrações aquosas sequenciais

realizadas. Os extratos aquosos obtidos por esse processo foram utilizados para determinação de sua composição bioquímica, a fim de determinar as melhores condições de extração.

3.2 Análise termogravimétrica

A composição dos extratos aquosos de *D. subspicatus* foi determinada por análise termogravimétrica utilizando analisador térmico STA 449 S3 Jupiter® (Netzsch) com temperatura programada entre 20 e 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de acordo com metodologia descrita por Larrosa et al. (2018).

FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS SEQUENCIAIS DA BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



LEGENDA: Ef1 – Extrato floculado em T amb; Ec1 – Extrato centrifugado em T amb
 Ef2 – Extrato floculado em T amb; Ec2 – Extrato centrifugado em T amb
 Ef3 – Extrato floculado em T amb; Ec3 – Extrato centrifugado em T amb

3.3 Determinação de carboidratos totais

Para a dosagem de carboidratos totais nos extratos aquosos foi utilizado o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando glucose (1 mg mL^{-1}) como padrão para confecção da curva de referência. Em linhas gerais, o método permite a quantificação de carboidratos totais através da hidrólise das ligações glicosídicas realizada pela ação do H_2SO_4 seguido da reação dos monossacarídeos livres com o fenol, resultando em um produto com coloração de tom castanho que tem seu pico de absorbância em 490 nm.

3.4 Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas totais nos extratos foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), com albumina soro bovina (BSA) na concentração de 1 mg mL^{-1} como padrão para confecção da curva de referência. O método baseia-se na determinação espectrofotométrica da intensidade de cor obtida com o reativo de Folin-Ciocalteu, depois de um tratamento com solução alcalina de cobre. O reativo utilizado oxida aminoácidos aromáticos como a tirosina e o triptofano presentes na maioria das proteínas. A reação é catalisada pelo cobre e produz como resultado uma coloração azul com pico de absorção em 660 nm.

3.5 Determinação da composição monossacarídica por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (GC-MS)

Para determinação da composição monossacarídica, os extratos aquosos foram submetidos à hidrólise ácida total com ácido trifluoroacético (TFA) 2 M e mantidas em estufa a 100°C por 2 horas. Após hidrólise, o TFA foi evaporado totalmente e os monossacarídeos resultantes foram ressolubilizados em água destilada, e posteriormente reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4). Em seguida, o pH foi neutralizado para remoção do excesso de agente redutor. O material foi seco e submetido a co-destilação com metanol, a fim de retirar o sal formado durante a neutralização. As amostras secas foram acetiladas para formação dos acetatos de alditóis que foram analisados por GC-MS.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa Varian 3800, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) Db-225 ms. O equipamento foi programado para uma temperatura inicial de 50 °C, com aumento gradativo de 40 °C por minuto, até atingir a temperatura de injeção de 230 °C, permanecendo constante durante a análise. O Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV com relação massa/carga (m/z). As análises foram realizadas por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis de fragmentação da amostra e padrões de monossacarídeos.

3.6 Ressonância magnética nuclear de ¹³C e ¹H

As análises por ressonância magnética nuclear (RMN), juntamente com a composição monossacarídica, tem por objetivo auxiliar a determinação da composição e estrutura de carboidratos presentes nas amostras. As análises foram realizadas em espectrômetro da marca Bruker (modelo DRX 400) com uma sonda de 5 mm (*widebore probe*), com frequências base de 100 MHz (¹³C) e 400 MHz (¹H). As análises foram realizadas a 50 °C. As amostras foram solubilizadas em água deuterada (D₂O, 99 %) para atingir a concentração de 80 mg mL⁻¹ para ¹³C e 15 a 20 mg mL⁻¹ para ¹H. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno (30,20 e 2,225 ppm para ¹³C e ¹H, respectivamente).

3.7 Determinação de fitormônios por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) para quantificação de fitormônios presentes nas amostras. Os tempos de retenção dos compostos foram comparados com o de padrões analíticos da classe das auxinas, citocininas, giberelinas e do ácido abscísico. Cada padrão foi analisado separadamente para determinação do tempo de retenção individual, gerando uma curva de calibração que serviu de referência para identificação e quantificação para cada molécula.

Os padrões de reguladores vegetais e as amostras foram solubilizados em água ultrapura e metanol 99,9%, em proporção de 80:20 (v v⁻¹) e filtrados em microfiltro de Politetrafluoretileno (PTFE) com poro de 0,22 µm. Ácido fórmico 85%, acetonitrila 99,9% e água ultrapura foram utilizados como solventes para compor a fase móvel, que consistia de dois solventes. Solvente A: 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila; e solvente B: 0,1% de ácido fórmico e água ultrapura.

A análise de cromatografia líquida foi realizada em um HPLC Shimadzu, equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm), com tamanho de partícula de 3 µm, utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: volume de injeção: 10 µL; fluxo: 0,4 L min⁻¹; temperatura de 40 °C e fase móvel: com gradiente de solventes A e B (Tabela 3).

TABELA 3 - GRADIENTE DE SOLVENTES NA FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE FITORMÔNIOS POR HPLC-MS

Tempo (min)	Acetonitrila + Ác. fórmico Solvente A (%)	Água + Ác. Fórmico Solvente B (%)
00:00	3	97
08:00	30	70
10:00	50	50
14:10	80	20
20:00	3	97

NOTA: Solvente A – acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico; Solvente B – Água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no modo positivo, com acoplamento do HPLC com um espectrômetro de massas Bruker MicrOTOF-Q II XL, com fonte de ionização por eletrodispersão (*eletrospray* – 100 eV) e o gás nebulizador nitrogênio (4 Bar, 200 °C).

3.8 Determinação da atividade bioestimulante vegetal

A atividade bioestimulante vegetal do extrato de *D. subspicatus* foi avaliada através de diferentes metodologias experimentais. Para determinação da ação do extrato aquoso foram realizados ensaios para avaliar seu efeito na germinação de sementes e nos estágios iniciais de desenvolvimento de alface (*Lactuca sativa*), seguida de aplicações foliares durante seu ciclo de crescimento, desde a formação de plântulas até o momento da colheita. Para as frações obtidas por cromatografia de

adsorção em coluna de sílica, foram avaliados os efeitos associados à atividade citocinínica e auxínica em cotilédone de pepino (*Cucumis sativus*). A seguir serão detalhadas as metodologias empregadas nos bioensaios, juntamente com as avaliações de parâmetros morfométricos.

3.8.1 Bioensaios de germinação e crescimento inicial de alface (*L. sativa*)

Os bioensaios de germinação e crescimento inicial de alface foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Novaes et al. (2016), com modificações realizadas por Torres et al. (2018). Foram utilizadas placas de Petri de vidro com diâmetro de 60 mm forradas com papel filtro colocados em sua base, ambos esterilizados em autoclave, sobre os quais foram adicionados 3 mL de extrato aquoso em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹) preparadas em água ultrapura, também usada como controle negativo. Cada tratamento consistiu de 6 replicas, com 10 sementes de alface lisa (*L. sativa*) por placa de Petri.

As microplacas seladas com filme de PVC foram mantidas em incubadora B.O.D. a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h por 7 dias. Após o período de germinação as plântulas obtidas foram avaliadas quanto as medidas de comprimento da raiz e hipocótilo e da área de superfície foliar dos cotilédones clorofilados determinadas através do programa computacional WinRhizo® acoplado a scanner la 1600 (Regent Instruments inc., Canadá).

3.8.2 Aplicações do extrato aquoso por pulverização foliar em plântulas de alface (*L. sativa*) germinadas em bandejas de poliestireno

A metodologia utilizada para a avaliação da ação do extrato aquoso no crescimento de plântulas de alface foi baseada na metodologia descrita por Mógor et al. (2018), com modificações. Sementes de alface lisa (*L. sativa*) foram plantadas em bandejas de poliestireno preenchidas com substrato comercial para germinação e obtenção de plântulas. Cada tratamento consistiu de 4 repetições independentes com 20 plântulas por repetição, totalizando 80 plântulas por tratamento. Cada repetição (n=20) foi tratada com 2 mL do extrato aquoso em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹) preparadas em água ultrapura, também usada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado mesmo volume de um fertilizante foliar

específico para hortaliças (FORTH HORTALIÇAS) na proporção de 6 mL L⁻¹. Foram realizadas aplicações foliares com borrifador aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura e aos 35 dias foram selecionadas aleatoriamente 10 plântulas de cada repetição (n=40) para avaliação da massa seca de folhas e raízes, bem como da área foliar e comprimento radicular. A determinação da área foliar e comprimento das raízes foi executada com o auxílio de imageamento por scanner, de acordo com metodologia descrita anteriormente; enquanto a determinação da massa seca foi realizada por gravimetria em balança analítica, após secagem do material em estufa a 65 ± 5 °C, até atingirem peso constante.

3.8.3 Aplicações foliares do extrato aquoso em plantas de alface (*L. sativa*) transplantadas para vasos individuais

Dando continuidade aos ensaios de atividade bioestimulante com plantas de alface descritos anteriormente, aos 35 dias após a semeadura foram transplantadas para vasos individuais 8 plantas do tratamento controle negativo (sem aplicação de extrato) para avaliação da ação do extrato aquoso de *D. subspicatus* nessa etapa de crescimento (8 plantas por tratamento). Cada vaso possuía volume útil de 1 L e foram preenchidos com terra de manejo orgânico, proveniente da Fazenda Experimental Canguiri – UFPR, suplementada com adubo comercial orgânico (esterco de aves) na proporção de 8/1 kg. Os tratamentos consistiram nas mesmas concentrações de extrato utilizados nas etapas anteriores (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹), juntamente com água ultrapura como controle negativo e fertilizante foliar comercial como controle positivo. As aplicações por pulverização foliar de 2 mL de extrato aquoso por planta foram realizadas no momento do transplântio (35 dias após semeadura) e repetidas aos 42, 49, 56 e 63 dias após semeadura. Aos 70 dias os ensaios foram encerrados e as plantas avaliadas quanto ao número de folhas e superfície foliar, bem como quanto sua massa seca, conforme metodologias descritas anteriormente.

3.9 Fracionamento do extrato aquoso por cromatografia de adsorção em coluna de sílica

Em paralelo aos ensaios de atividade bioestimulante com o extrato aquoso de *D. subspicatus*, foi realizado seu fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna de sílica em escala preparativa, com a finalidade de separar os diferentes compostos constituintes do extrato e possibilitar a avaliação da atividade bioestimulante vegetal das frações isoladamente, bem como a determinação de suas composições. O fracionamento foi realizado em coluna com volume total de 300 mL, fase estacionária composta por sílica gel 60 (Sigma-Aldrich) e fase móvel composta de uma mistura de solventes – acetato de etila:metanol:água (8:2:1), a fim de separar os diferentes compostos em função de suas diferenças de polaridade.

Os eluatos foram coletados em tubos de ensaio individuais em alíquotas de 10 mL para dosagens de carboidratos totais e avaliação por cromatografia de camada delgada (TLC sílica gel 60 f₂₅₄ - Merck) com fase móvel específica para separação de carboidratos composta de acetato de etila:ácido acético:propanol:água (4:2:2:1), revelada por orcinol:ácido sulfúrico, para posteriormente serem reunidos em frações de maior volume, em função de sua homogeneidade. As frações resultantes foram avaliadas quanto a presença de glicosídeos por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H); bem como quanto a quantificação de fitormônios por cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS). A atividade bioestimulante das frações individuais foi avaliada pelos bioensaios com cotilédone de pepino (*Cucumis sativus*) para determinação de possíveis atividades citocinínica e/ou auxínica.

3.10 Determinação da atividade citocinínica e/ou auxínica das frações obtidas por cromatografia de adsorção em coluna de sílica

Em função da complexidade bioquímica da composição do extrato aquoso de *D. subspicatus*, foi realizado seu fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna de sílica para obtenção de frações com composição mais uniforme. Estas foram avaliadas em bioensaios com o objetivo de elucidar quais compostos presentes no extrato aquoso possuem maior atividade bioestimulante. Para tanto, foram realizados ensaios para determinar atividades relacionadas à ação de citocininas e auxinas em modelo de cotilédone de pepino (*C. sativus*), baseados na metodologia descrita por Zhao et al. (1992).

Para os bioensaios de atividade auxínica e citocinínica, sementes de pepino (*C. sativus*) foram germinadas em placas de Petri contendo ágar 0,7% (m v^{-1}) e mantidas no escuro em incubadora B.O.D. por 3 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período os cotilédones foram excisados e distribuídos em placas de Petri forradas com papel filtro embebidos com 3 mL das diferentes frações obtidas por cromatografia de adsorção na concentração de 1 g L^{-1} . Cada tratamento consistiu de 3 repetições com 10 cotilédones em cada placa.

Para correlação da resposta obtida pelas frações com uma possível atividade auxínica foram realizados bioensaios com o ácido-indol-acético (AIA) como auxina de referência, com concentrações de 0; 0,1; 1; 5; 50; e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Da mesma forma, a fim de correlacionar os resultados obtidos nos bioensaios com as frações a uma possível atividade citocinínica, foram realizados bioensaios com a Zeatina (Z) como citocinina de referência, nas mesmas concentrações (0; 0,1; 1; 5; 50; e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para os ensaios de atividade citocinínica, as placas permaneceram em incubadora B.O.D. com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 dias e após esse período os cotilédones foram pesados em balança analítica para avaliação do ganho de massa. Para os ensaios de atividade auxínica, as placas permaneceram no escuro durante 5 dias em incubadora B.O.D. com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e após esse período foram avaliados o número e comprimento total das raízes emitidas pelos cotilédones.

3.11 Tratamento estatístico

Todos a variáveis foram avaliadas estatisticamente aplicando análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos. Dados com p valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 8 (version 8.0.2 graphpad software inc, 2010, San Diego, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biomassa de *D. subspicatus* produzida em fotobiorreator foi recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante, entretanto, para utilização do extrato para avaliação da atividade bioestimulante vegetal foram comparados os

rendimentos e composições dos diferentes extratos aquosos. Foram avaliadas três metodologias para obtenção do extrato de *D. subspicatus*, todas usando água ultrapura como solvente e diferindo entre si pela temperatura de extração. Dois diferentes lotes de biomassa (centrifugada e floculada) foram utilizados para a realização das extrações aquosas, produzindo assim seis extratos: Extrato em temperatura ambiente – biomassa centrifugada (Ec1); Extrato em temperatura ambiente – biomassa floculada (Ef1); Extrato a 80 °C – biomassa centrifugada (Ec2); Extrato a 80 °C – biomassa floculada (Ef2); Extrato a 120 °C – biomassa centrifugada (Ec3); e Extrato a 120 °C – biomassa floculada (Ef3). A Tabela 4 apresenta os dados de rendimento mássico, proteínas e carboidratos totais e composição monossacarídica dos extratos aquosos obtidos da biomassa.

TABELA 4 - RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Desmodemus subspicatus*

Extrato	Rendimento (%)	Proteínas (%) ^a	Carboidratos (%) ^b	Composição monossacarídica (mol %) ^c						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Ec1	16.0	16.3	22.7	Tr	Tr	Tr	Tr	27.9	38.5	32.3
Ef1	15.8	16.4	22.3	Tr	Tr	Tr	Tr	28.2	36.4	31.4
Ec2	4.4	13.2	32.1	Tr	Tr	Tr	Tr	27.6	22.3	51.2
Ef2	4.6	13.5	33.4	Tr	Tr	Tr	Tr	25.4	24.1	48.2
Ec3	5.1	10.5	22.3	1.0	1.5	1.4	1.0	12.3	19.0	54.6
Ef3	5.4	10.8	23.5	1.1	1.7	1.6	1.2	13.8	20.5	55.8

NOTA: Determinado pelos métodos: DUBOIS et al. (1956)^a; LOWRY et al. (1951)^b. ^c Monossacarídeos quantificados em mols % na forma de acetato de alditóis, por GC-MS. Tr: traços (< 1 mol%)

Os extratos aquosos obtidos em temperatura ambiente apresentaram maiores rendimentos de extração (aprox. 16%) quando comparados aos rendimentos dos extratos obtidos em 80 e 120 °C (aprox. 4,5 e 5,3%, respectivamente). No entanto, quando analisadas as características dos extratos obtidos na mesma temperatura de extração, diferindo entre si por serem floculados ou não, é possível observar a consistência da composição dos extratos. Ec1 e Ef1, ambos obtidos em temperatura ambiente, apresentam valores semelhantes de rendimento mássico; conteúdo de proteínas e carboidratos totais; além da composição monossacarídica, com galactose, glucose e manose como os principais componentes. A mesma tendência se mantém

ao analisar os resultados dos extratos Ec2 e Ef2, obtidos a 80 °C, com rendimento e teor de proteínas inferior aos extratos anteriores, mas com carboidratos totais e teores de glucose superiores. Para os extratos Ec3 e Ef3, obtidos a 120 °C, foi registrada uma maior riqueza de monossacarídeos, com baixos teores de ramnose, fucose, arabinose e xilose, mas altos teores de glucose quando comparados aos demais extratos.

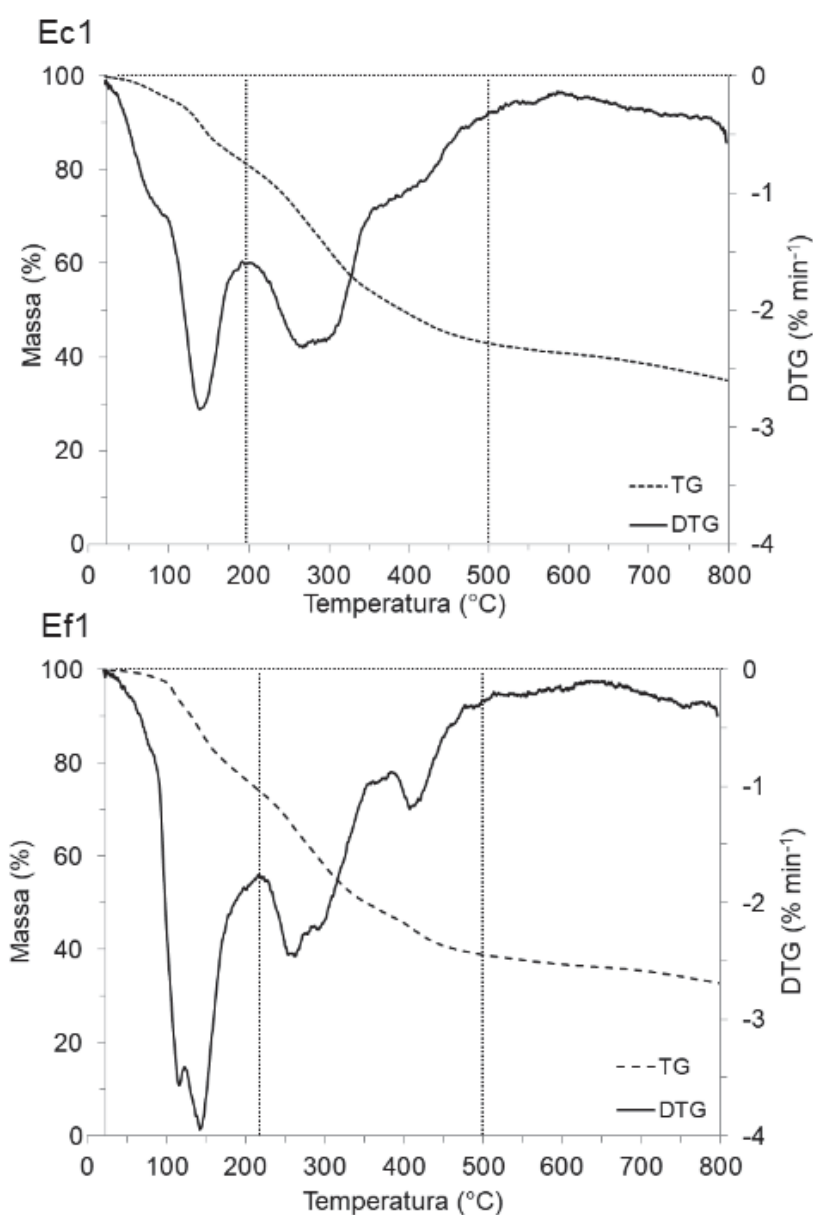
Os resultados de rendimento e composição observados para os diferentes extratos aquosos obtidos corroboram os dados de Mazepa (2013) e Oliveira (2017), que avaliaram a extração de compostos de baixa massa molecular da biomassa de *D. subspicatus* cultivada em condições de crescimento autotrófico, seguida de diálise com membrana com *cut-off* de 1 kDa. A consistência na composição dos extratos obtidos sob as mesmas condições indica que a adição da quitosana como agente flocculante não interferiu na composição química dos extratos. Uma vez que o rendimento mássico dos extratos obtidos em temperatura ambiente foi aproximadamente três vezes superior às demais extrações, essa foi escolhida para dar sequência nas análises.

A fim de complementar as análises colorimétricas e correlacionar com os resultados de composição, foram realizadas análises termogravimétricas dos extratos obtidos em temperatura ambiente (Ec1 e Ef1). A análise termogravimétrica permite avaliar a degradação térmica dos compostos presentes nos extratos e sua consequente perda de massa em função do aumento da temperatura utilizada. Para os extratos avaliados é possível destacar três regiões distintas: a primeira onde ocorre a perda de umidade presente na amostra; a segunda onde são degradadas a maioria dos compostos presentes no extrato; e uma terceira etapa de perda de massa relacionada à decomposição térmica de compostos carbonáceos mais estáveis. A Figura 15 apresenta os perfis de perda de massa (TG) e sua derivada (DTG) para os extratos aquosos obtidos em temperatura ambiente (Ec1 e Ef1).

Para o extrato Ec1 o primeiro estágio de degradação térmica é observado entre 20 e 200 °C e corresponde a uma perda de massa de 19,2%. Esse evento está associado a perda de água presente na amostra e possui grande amplitude térmica em função do extrato ser altamente higroscópico, uma vez que é composto majoritariamente por moléculas de baixa massa (MAZEPA, 2013). O segundo evento de degradação ocorre entre 200 e 500 °C com perda de 37,9% da massa do extrato e corresponde a degradação da maioria dos carboidratos e proteínas presentes.

Quando comprado esse valor com os resultados apresentados na Tabela 4, observa-se semelhança entre os valores, sendo que a soma de carboidratos e proteínas totais presentes em Ec1 é de 39%. Por fim, o terceiro evento de degradação ocorre entre 500 e 800 °C com perda de 7,7% da massa do extrato e corresponde a degradação de compostos carbonáceos mais estáveis. Ao final da análise é possível destacar a presença de 35,2% de cinzas residuais, o que pode ser atribuído a presença de sais remanescentes do meio de cultivo.

FIGURA 15 - CURVAS DE TG E DTG DOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS EM TEMPERATURA AMBIENTE



LEGENDA: Ec1 – Extrato aquoso centrifugado Ef1 – Extrato aquoso floculado

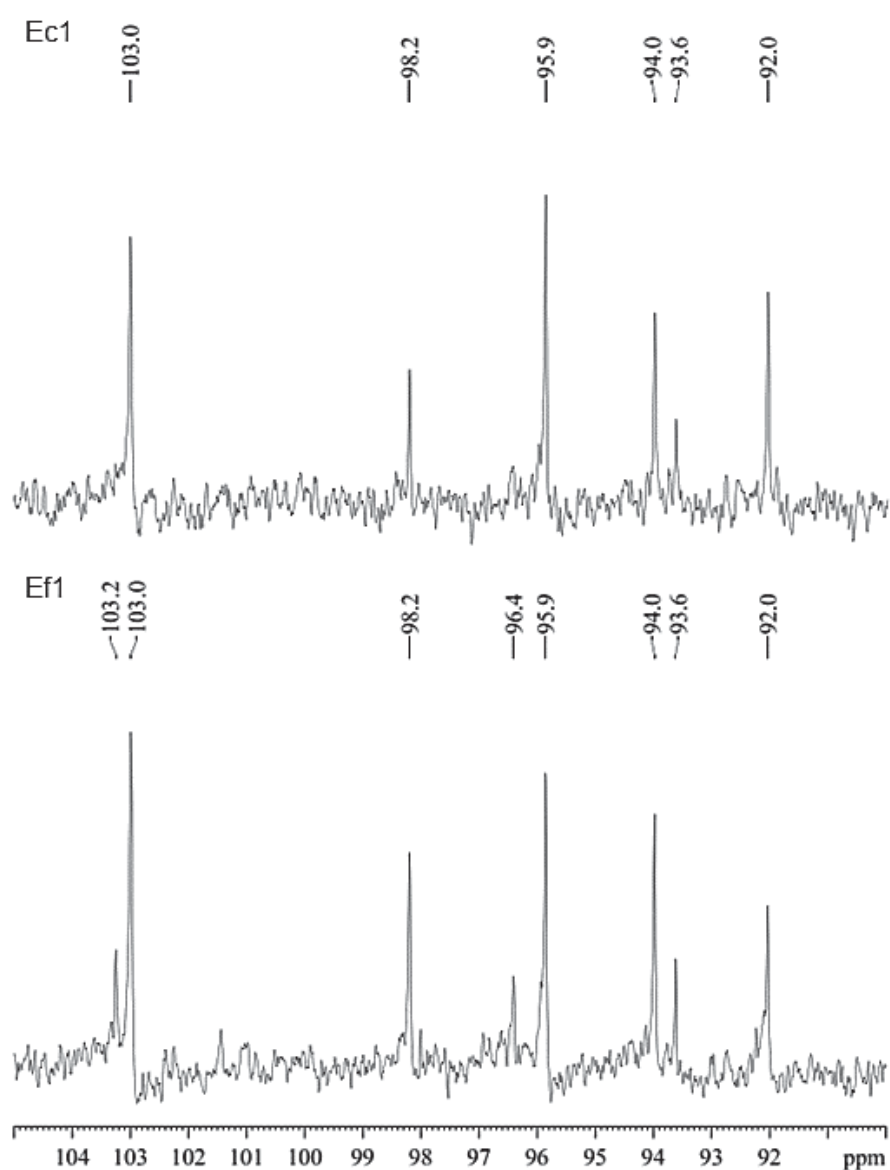
O extrato Ef1 apresenta as mesmas características de Ec1. O primeiro evento de degradação ocorre entre 20 e 220 °C com perda de 25,4% da massa do extrato relacionada a perda de água da amostra. É possível que a diferença observada em relação a Ec1 esteja relacionada somente ao armazenamento do extrato para a análise, o que de alguma maneira pode ter favorecido a absorção de umidade pelo extrato. O segundo evento ocorre entre 220 e 500 °C e corresponde a perda de 35,8% da massa e, assim como para Ec1, está associado com a degradação de carboidratos e proteínas, principalmente. Quando comparado com a soma dos teores de carboidratos e proteínas obtidos pelos ensaios colorimétricos (38,7%), é possível observar que os valores são próximos, diferindo em apenas 2,9%. O terceiro e último evento de degradação térmica compreende a faixa de temperatura que vai de 500 a 800 °C e apresenta perda de 5,9% da massa do extrato e assim como Ec1, refere-se à decomposição de compostos carbonáceos mais estáveis. Ao final da análise foi registrado um total de 32,9% de cinzas e compostos inorgânicos. Oliveira (2017) realizou análises de TG e DTG do extrato aquoso de *D. subspicatus* fracionado por diálise para obtenção de moléculas de baixa massa moléculas (≤ 1 kDa) e observou perfis de degradação térmica muito semelhantes, reforçando os resultados de composição de macromoléculas do extrato aquoso utilizado no presente trabalho.

Com o objetivo de determinar a influência da quitosana utilizada na floculação sobre a composição do extrato Ef1 foi realizada uma análise de RMN de ^{13}C para avaliar a presença desse polímero no extrato aquoso. Foram realizadas análises de RMN de ^{13}C para assinalamento dos carbonos anoméricos presentes nos extratos Ec1 e Ef1 e posterior comparação com os resultados obtidos por Mazepa (2013). A Figura 16 apresenta a região anomérica e os assinalamentos dos C-1 dos carboidratos presentes nos extratos Ec1 e Ef1.

Ambos os extratos apresentam praticamente os mesmos sinais de carbonos anoméricos referentes aos glicosídeos sulfoquinovosil-glicerol (98,2 ppm), monogalactosil-glicerol (103,0 ppm) e digalactosil-glicerol (103,2 e 98,2 ppm), além dos monossacarídeos glucose (92,0 ppm), galactose (92,0 e 96,4 ppm) e manose (94,0 e 93,6 ppm), em suas configurações α e β , respectivamente. A identificação desses compostos foi possível pela comparação dos sinais dos seus carbonos anoméricos com os dados descritos por Mazepa (2013) e posteriormente corroborados por Oliveira (2017), uma vez que em ambos os trabalhos foram

analisadas as moléculas de baixa massa presentes na fração purificada do extrato aquoso de *D. subspicatus*. O glicosídeo monogalactosil-glicerol é composto por uma unidade de β -D-galactopiranosose com substituição em C-1 por uma molécula de glicerol; enquanto o glicosídeo digalactosil-glicerol é composto por uma unidade de β -D-galactopiranosose ligada em C-1 a uma unidade de α -D-galactopiranosose substituída em C-1 por uma molécula de glicerol.

FIGURA 16 - ASSINALAMENTOS DE C-1 POR RMN DE ^{13}C DOS EXTRATOS Ec1 E Ef1



Os glicosídeos encontrados no extrato de *D. subspicatus* são constituintes de galacto e glicolipídeos de membranas de tilacóides nos cloroplastos de algas e plantas (SASSAKI et al., 1999). A Tabela 5 resume os assinalamentos dos carbonos anoméricos relativos aos glicosídeos e monossacarídeos presentes no extrato, juntamente com seus correspondentes obtidos de outros trabalhos.

TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DOS CARBONOS ANOMÉRICOS DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DE *Desmodesmus subspicatus*

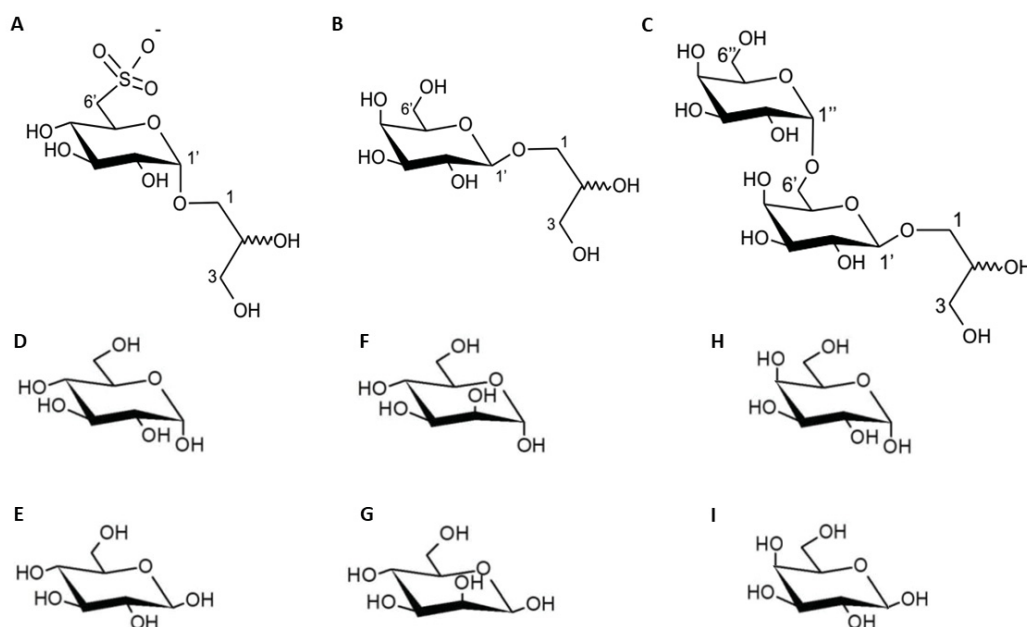
UNIDADES		DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)		
		A	B	C
		Sulfoquinovosil-glicerol		
α -D-Sulfoquinovose-(1 \rightarrow		98,2	98,3	98,2
		Digalactosil-glicerol		
6- β -D-Galactopiranoze-(1 \rightarrow		103,2	103,2	103,0
α -D-Galactopiranoze-(1 \rightarrow		98,2	98,3	98,3
		Monogalactosil-glicerol		
β -D-Galactopiranoze-(1 \rightarrow		103,0	103,0	103,2
		Monossacarídeos		
α -D-Glucopiranoze		92,0	92,1	92,1
β -D-Glucopiranoze		95,9	95,9	95,9
α -D-Galactopiranoze		92,0	92,3	92,3
β -D-Galactopiranoze		96,4	96,5	96,4
α -D-Manopiranoze		94,0	94,0	93,9
β -D-Manopiranoze		93,6	93,6	93,6

NOTA: A: Presente estudo; B: Oliveira, 2017; C: Mazepa, 2013

Além de fazerem parte da membrana dos tilacoides, acredita-se que os glicosídeos obtidos no extrato aquoso possuem funções associadas a respostas frente ao estresse abiótico. Segundo Moellering e Benning (2011), em condições de privação de fosfato ocorre um remodelamento das membranas intracelulares com a substituição dos fosfoglicerolipídeos pelo digalactosil-diacilglicerol, indicando que o papel desses compostos pode ir além da sua função estrutural.

Adicionalmente aos glicosídeos mencionados anteriormente, foram ainda identificadas unidades monossacarídicas de glucose, galactose e manose presentes no extrato. Nos trabalhos realizados por Mazepa (2013) e Oliveira (2017) os mesmos compostos foram identificados. Cabe pontuar que o extrato aquoso “bruto” como foi utilizado no presente estudo não difere muito do utilizado nos estudos mencionados, uma vez que a fração eluída em membrana de diálise com *cut off* de 1 kDa representa cerca de 90% do rendimento mássico do extrato aquoso. Sendo assim, é possível concluir que a composição de monossacarídeos e glicosídeos encontrados no presente trabalho assemelha-se à composição observada nos trabalhos mencionados, permitindo uma melhor correlação entre os resultados de atividade biológica. A Figura 17 ilustra a estrutura química dos glicosídeos sulfoquinovosil-glicerol (A); monogalactosil-glicerol (B); e digalactosil-glicerol (C); além dos monossacarídeos α e β glucopiranoose (D-E); α e β manopiranoose (F-G); e α e β galactopiranoose (H-I) presentes no extrato aquoso de *D. subspicatus*.

FIGURA 17 - ESTRUTURA DOS GLICOSÍDEOS E MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Desmodemus subspicatus*



LEGENDA: A) sulfoquinovosil-glicerol; B) monogalactosil-glicerol; C) digalactosil-glicerol
D) α -glucopiranoose; E) β -glucopiranoose; F) α -manopiranoose
G) β -manopiranoose; H) α -galactopiranoose; I) β -galactopiranoose

Os resultados de rendimento, composição de carboidratos e proteínas totais, análise termogravimétrica e RMN de ^{13}C indicaram não haver grandes diferença entre

a composição do extrato aquoso obtido por centrifugação (Ec1) daquele obtido por floculação com quitosana (Ef1). A ausência de sinais referentes a quitosana no extrato floculado pode ser explicada por este ser um polímero que apresenta baixa solubilidade no pH neutro no qual a extração é realizada. Dessa forma, a quitosana adsorvida na biomassa recuperada dos cultivos em fotobiorreator não é extraída juntamente com os monossacarídeos e glicosídeos encontrados. Por essa razão, para as demais etapas de determinação de fitormônios e avaliação da atividade bioestimulante vegetal, foi utilizada somente o extrato Ef1, sendo a partir de agora denominado somente como extrato aquoso.

Após a definição do extrato aquoso para prosseguimento nas análises foi realizada a determinação dos fitormônios presentes no extrato por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS). A fim de construir uma curva de referência para comparação com o extrato aquoso foi utilizado uma mistura de dez padrões de reguladores comerciais, para definição dos seus tempos de retenção. A Tabela 6 resume as informações referentes aos padrões de reguladores vegetais utilizados.

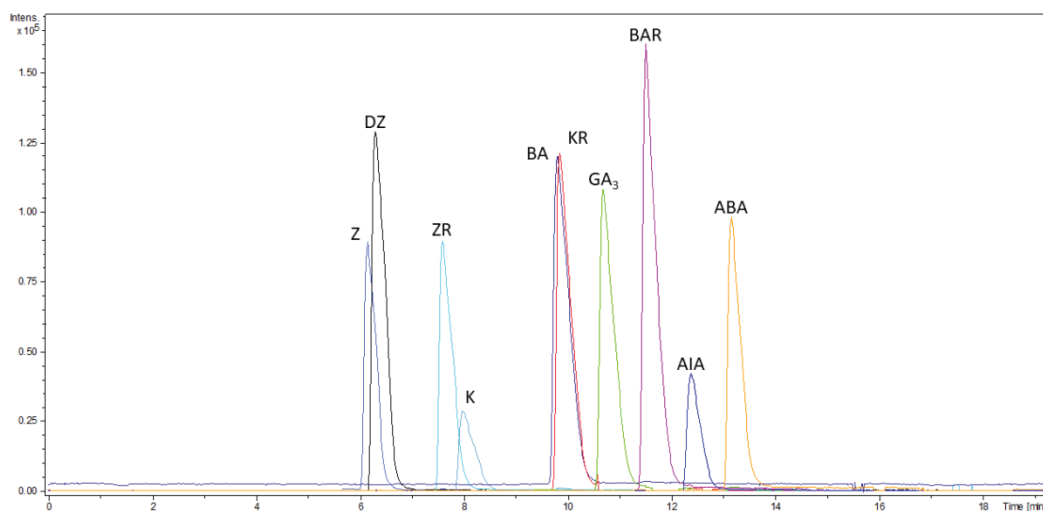
TABELA 6 – RAZÃO MASSA-CARGA E TEMPO DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DE REGULADORES VEGETAIS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE HPLC-MS

Padrões de fitormônios	Íon precursor [M+H]⁺ m/z	Tempo de retenção (min)
<i>trans</i> -Zeatina (Z) - C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	220,1193	6,1
Dihidrozeatina (DZ) - C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O	222,1349	6,2
Zeatina ribosídeo (ZR) - C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₅	352,1615	7,5
Cinetina (K) - C ₁₀ H ₉ N ₅ O	216,0880	7,9
Benziladenina (BA) - C ₁₂ H ₁₅ N ₅	226,1087	9,8
Cinetina ribosídeo (KR) - C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅	348,1302	9,8
Ácido giberélico (GA ₃) - C ₁₉ H ₂₂ O ₆	347,1489	10,6
Benziladenosina (BAR) - C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄	358,1510	11,4
Ácido indol acético (AIA) - C ₁₀ H ₉ NO ₂	176,0706	12,3
Ácido abscísico (ABA) - C ₁₅ H ₂₀ O ₄	265,1434	13,1

Foram utilizados padrões de reguladores vegetais das classes das citocininas: *trans*-zeatina, dihidrozeatina, zeatina ribosídeo, cinetina, cinetina ribosídeo, benziladenina e benziladenosina; das giberelinas: ácido giberélico; das auxinas: ácido-indol-acético; e do ácido abscísico. As características químicas e polaridade dos

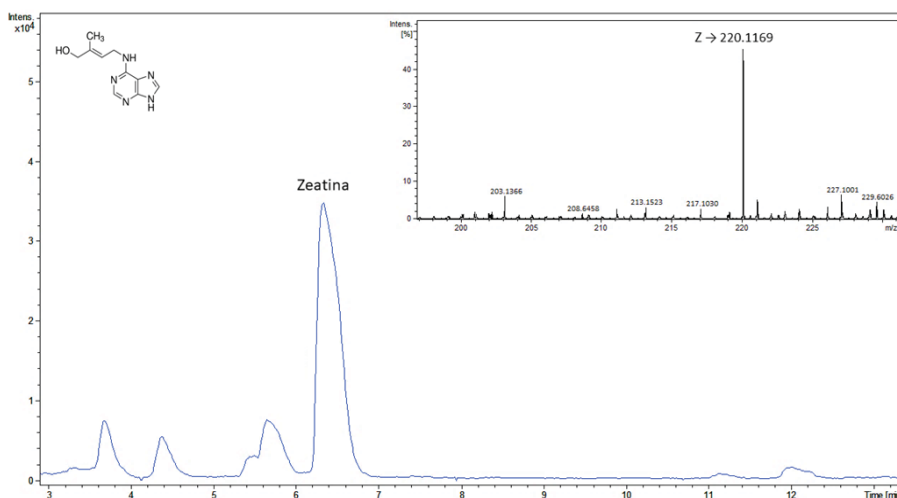
fitormônios permitiram a separação desses compostos por cromatografia em coluna C18 com diferentes tempos de retenção (Figura 18).

FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE REGULDORES VEGETAIS



O perfil de eluição dos compostos presentes no extrato aquoso de *D. subspicatus* mostrou a presença de um composto com tempo de retenção de 6,1 min, com razão massa carga $[m/z]$ de 220,1169, o que permite inferir a presença da citocinina *trans*-zeatina na concentração de $45,8 \text{ ng mg}^{-1}$ (Figura 19), o que representa $7,2 \text{ ng mg}^{-1}$ de biomassa de *D. subspicatus*. Zeatina é uma citocinina relacionada aos processos de crescimento vegetal indizindo a divisão celular em regiões meristemáticas. Além da *trans*-zeatina a análise do extrato aquoso de *D. subspicatus* mostrou a presença de ácido abscísico em concentrações abaixo do limite de detecção da metodologia utilizada, caracterizando sua presença como traços. As funções fisiológicas do ácido abscísico nos vegetais estão associadas principalmente a inibição do crescimento vegetal

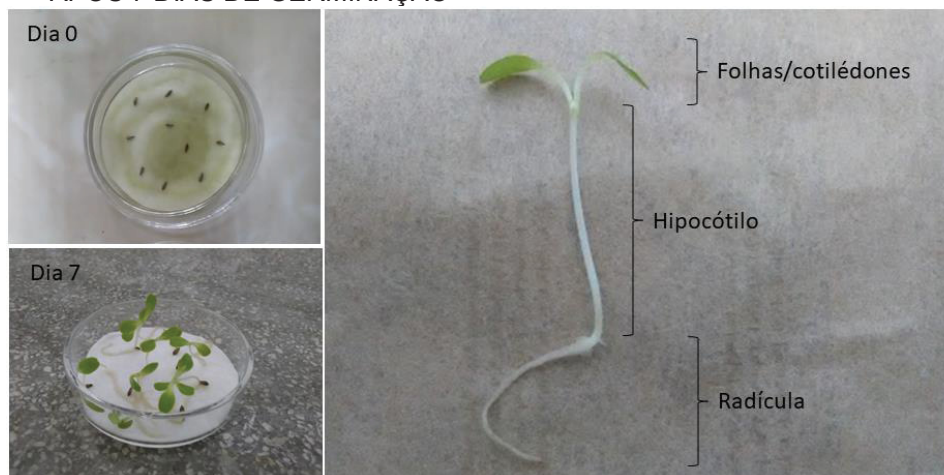
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DA ZEATINA NO EXTRATO AQUOSO



A presença de fitormônios em microalgas já é conhecida da literatura científica, Stirk et al. (2013) identificaram e quantificaram fitormônios em 24 espécies de microalgas, incluindo ácido indol acético. Adicionalmente os autores identificaram 19 tipos de citocininas, entre elas a *trans*-zeatina. Ördög et al. (2004) identificaram a presença de zeatina nas microalgas *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorella minutissima*, e *Protococcus viridis*. Jirásková et al. (2009), quantificaram fitormônios em diversos gêneros da microalga *Chlorella*, utilizando diferentes métodos para quantificar, entre eles HPLC-MS.

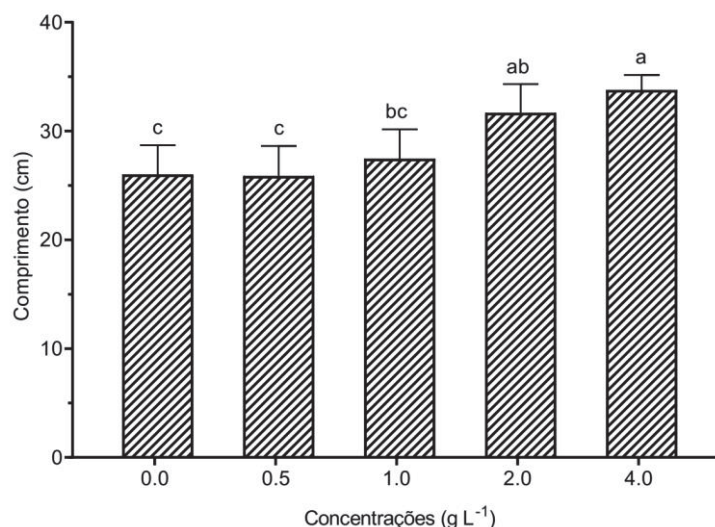
O extrato aquoso de *D. subspicatus* foi avaliado quanto sua capacidade bioestimulante vegetal pela realização de bioensaios com modelo de alface lisa (*Lactuca sativa* cultivar Elisa) em três etapas sequenciais: Germinação de sementes em placas de Petri; aplicações foliares em mudas semeadas em bandejas de poliestireno; e aplicações foliares em plantas cultivadas em vasos plásticos individuais até o momento da colheita. A primeira etapa consistiu na avaliação da germinação das plântulas 7 dias após a semeadura, pela determinação da superfície do primeiro par de folhas (cotilédones clorofilados), comprimento do hipocótilo e da radícula das plântulas (Figura 20).

FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DAS PLÂNTULAS APÓS GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE APÓS 7 DIAS DE GERMINAÇÃO



A soma do comprimento das radículas das plantas germinadas em placas de Petri indica que o extrato aquoso de *D. subspicatus* induziu maior crescimento das raízes quando comparados os tratamentos controle (água destilada) com os tratamentos com diferentes concentrações de extrato (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹). Na Figura 21 é possível identificar um padrão de resposta linear entre a concentração crescente de extrato e o comprimento total das raízes. A maior concentração de extrato resultou no maior comprimento de raízes, sendo significativamente maior que o tratamento controle. Esses resultados corroboram dados obtidos por Oliveira (2017), que avaliou a etapa de enraizamento de sementes de milho em meio contendo extrato de *D. subspicatus* e conclui que o extrato aumentou o volume e o comprimento do sistema radicular das plântulas tratadas, com resposta superior ao observado para os controles positivo e negativo.

FIGURA 21 – COMPRIMENTO TOTAL DAS RAÍZES NAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO

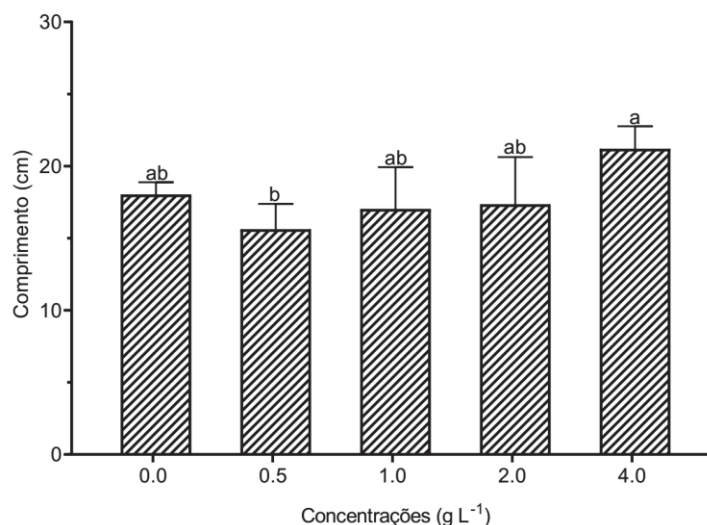


NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

O sistema radicular formado nas primeiras etapas de desenvolvimento dos vegetais é de grande importância para a assimilação dos compostos presentes no substrato no qual as plântulas estão localizadas. A obtenção de plântulas com maior comprimento das primeiras raízes pode resultar em plantas mais vigorosas nas demais etapas de crescimento. De acordo com Neto et al. (2014) plantas com sistema radicular mais comprido possuem maior capacidade de absorção de nutriente e água do solo, o que as torna menos suscetíveis a mudanças ambientais e restrição de água.

Quando avaliado o comprimento total dos hipocótilos das plântulas de alface germinadas na presença de extrato, nota-se a mesma tendência de correlação entre as concentrações crescentes de extrato e o comprimento dos hipocótilos (Figura 22). O hipocótilo é a estrutura responsável pela elevação dos cotilédones e do epicótilo após a germinação das sementes epígeas e o seu comprimento é uma medida de crescimento relacionada com a capacidade de emersão das plântulas acima da linha do solo (COSTA et al., 1999). Sendo assim, a obtenção de plântulas com maior comprimento de hipocótilo é fundamental para responder às resistências físicas do solo e permitir a correta sustentação e bom desenvolvimento das plântulas.

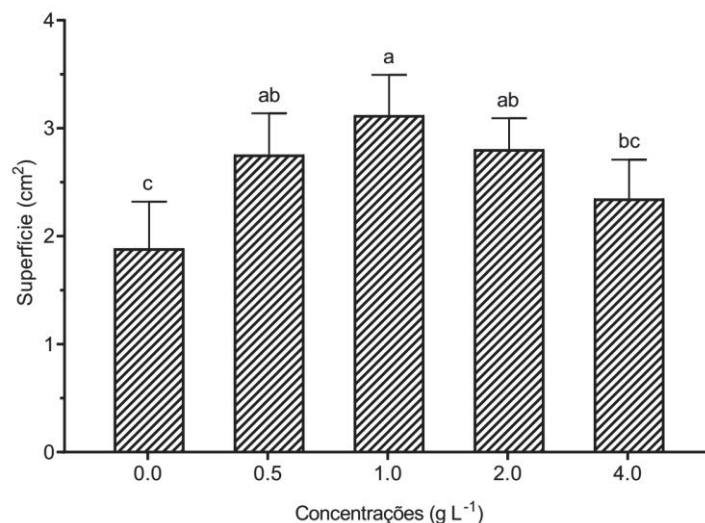
FIGURA 22 - COMPRIMENTO TOTAL DOS HIPOCÓTILO DAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO AQUOSO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Por fim, a determinação da superfície foliar das plântulas após germinação resultou em um perfil de resposta diferente das análises anteriores. A Figura 23 demonstra que entre as concentrações de extrato avaliadas, a melhor resposta foi referente à concentração de 1,0 g L⁻¹, sendo que tanto concentrações maiores quanto menores apresentaram respostas inferiores. Cabe destacar que o primeiro par de folhas desenvolvidos após a germinação corresponde aos cotilédones responsáveis pela nutrição do embrião durante as primeiras etapas de desenvolvimento, até a síntese de clorofila e início da nutrição fotoautotrófica (HANLEY; FEGAN, 2006). Zhang et al. (2008) demonstraram que o desenvolvimento dos cotilédones em plântulas em estádios iniciais de crescimento promoveu um melhor desenvolvimento das plantas em estádios mais avançados.

FIGURA 23 - SUPERFÍCIE FOLIAR DAS PLÂNTULAS DE ALFACE APÓS GERMINAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

De maneira resumida, os bioensaios indicaram que o extrato aquoso de *D. subspicatus* possui efeito bioestimulante nas plântulas de alface germinadas em placa de Petri. Para as respostas morfológicas comprimento da radícula e comprimento do hipocótilo a maior concentração de extrato utilizada apresentou os melhores resultados, enquanto para a superfície foliar dos cotilédones clorofilados apresentou melhor resposta para a concentração de 1,0 g L⁻¹. Como resultados de aplicação prática, os dados indicam que a ação do extrato pode resultar em plântulas com maior capacidade de fixação ao solo, sustentação da parte aérea e melhor aproveitamento da luminosidade para realização de fotossíntese.

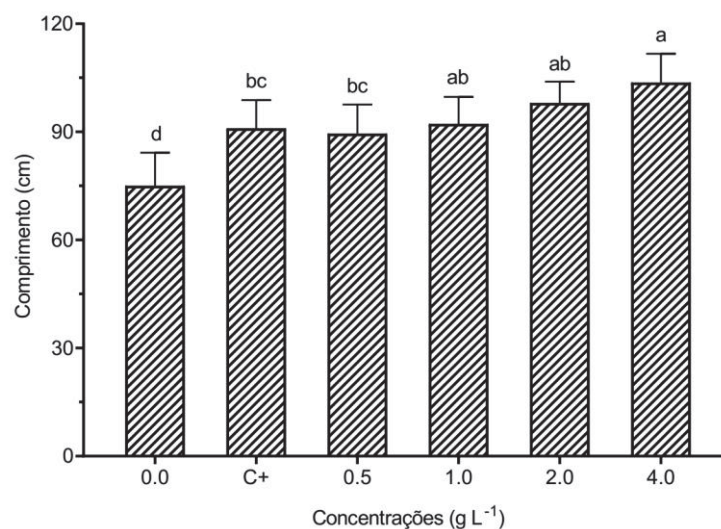
A fim de avaliar o efeito do extrato aquoso nas diferentes etapas de desenvolvimento da alface foram realizados bioensaios utilizando mudas semeadas em bandejas de poliestireno para determinação do comprimento e massa seca das raízes e da área superficial e massa seca foliar (Figura 24).

FIGURA 24 - BIOENSAIOS COM MUDAS DE ALFACE EM BANDEJAS DE POLIESTIRENO COM APLICAÇÕES FOLIARES DE EXTRATO AQUOSO MICROALGAL



De maneira similar aos resultados observados nas plântulas obtidas na etapa de germinação, as mudas tratadas com o extrato aquoso por aspersão foliar demonstraram maior comprimento total das raízes com um perfil de resposta crescente em função do aumento da concentração do extrato. A concentração de $4,0 \text{ g L}^{-1}$ produziu mudas com comprimento radicular maior do que todos os tratamentos, diferindo significativamente dos controles negativo (Água) e positivo (Fertilizante foliar para o crescimento de hortaliças). A Figura 25 apresenta os resultados de comprimento total das raízes das mudas de alface tratadas por aspersão foliar com diferentes concentrações de extrato.

FIGURA 25 - COMPRIMENTO TOTAL DAS RAÍZES DAS MUDAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO

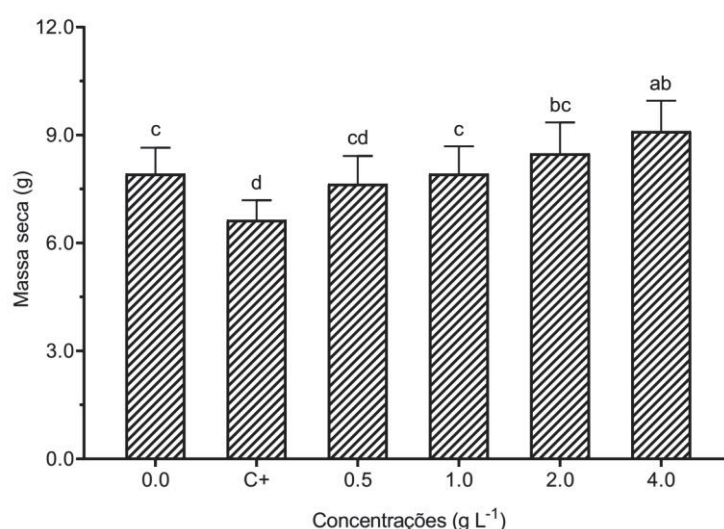


NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

O maior desenvolvimento do sistema radicular permite maior absorção de nutrientes do solo e maior capacidade de fixação ao substrato, sendo fundamental para um bom desenvolvimento das mudas. Guimarães et al. (2002) apontam que a produção de mudas é uma das etapas mais importantes para o sistema de produção de hortaliças, influenciando diretamente a desempenho das culturas e sua produtividade. O crescimento das raízes está mais diretamente associado a ação de reguladores como o ácido indol acético, uma auxina que promove a divisão, alongamento e diferenciação celular. Entretanto, não foi detectada a presença desse fitormônio no extrato aquoso pelas análises de HPLC-MS. Ainda assim, é importante destacar que os processos envolvidos na formação e desenvolvimento das raízes depende não somente da presença de auxinas, mas também do balanço hormonal na planta, além da ação de outras moléculas que possam atuar de forma isolada ou sinérgica para essa finalidade.

O perfil de resposta concentração/dependente observado para o comprimento também foi observado na determinação da massa seca das raízes (Figura 26). Vale destacar que o tratamento utilizado como controle positivo resultou na menor massa seca dentre todos os tratamentos, diferente do observado para o comprimento. Esses dados podem ser explicados pela sua finalidade de aplicação foliar, resultando no desenvolvimento da parte aérea em detrimento do sistema radicular.

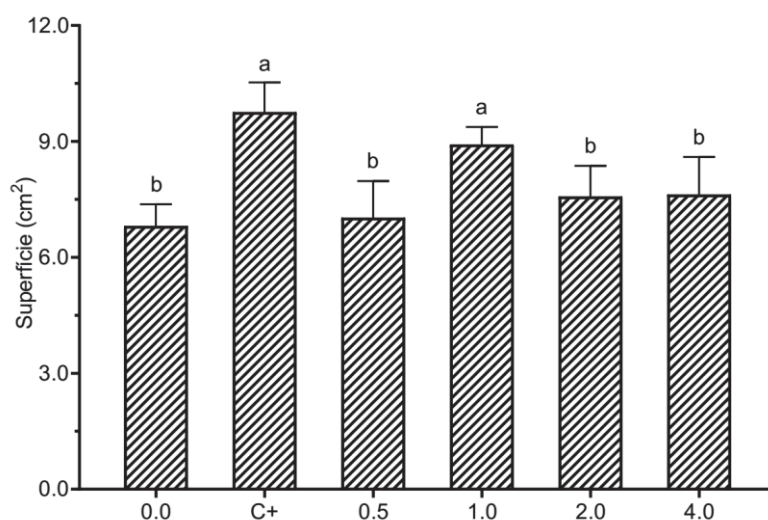
FIGURA 26 - MASSA SECA RADICULAR DAS MUDAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

A determinação da superfície foliar das mudas de alface demonstrou um perfil de resposta semelhante ao registrado no bioensaio de germinação, com os melhores resultados referentes ao controle positivo e à concentração de extrato aquoso de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 27). A qualidade das plântulas produzidas no início do desenvolvimento das hortaliças pode garantir a homogeneidade da cultura e resultar em maior produtividade de redução do tempo necessário para a colheita (FRANCO; PRADO, 2008).

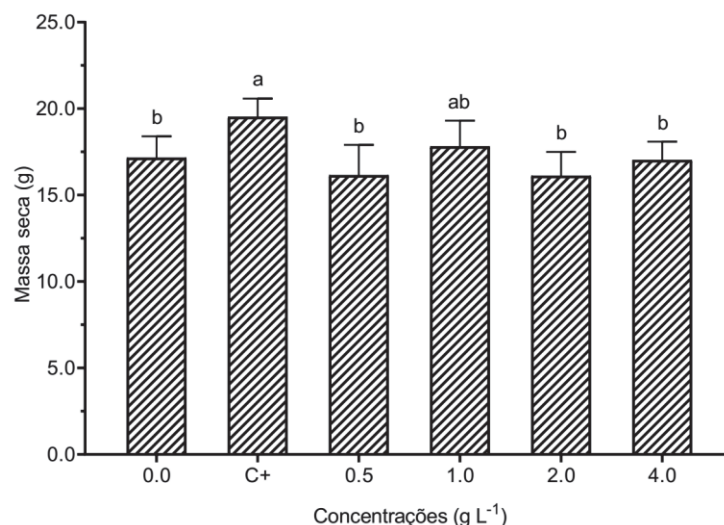
FIGURA 27 - SUPERFÍCIE FOLIAR DAS MUDAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

A massa seca foliar das mudas de alface reflete diretamente a resposta de superfície foliar, com o tratamento controle sendo o melhor resultado obtido, não diferindo da concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato aquoso (Figura 28). Mógor et al. (2018) avaliaram a aplicação de suspensões de hidrolisados de cianobactérias no crescimento da alface e verificaram o aumento da superfície foliar e da massa seca nas mudas tratadas com os hidrolisados produzidos sob maior tempo de reação. Ainda que as espécies não apresentem proximidade taxonômica, a utilização de micro-organismos fotossintetizantes como fonte de compostos com atividade bioestimulante é cada vez mais desejada.

FIGURA 28 - MASSA SECA FOLIAR DAS MUDAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

A alface é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o país, resultado de sua plasticidade fenotípica que lhe permite grande adaptação a condições adversas, possibilidade de cultivos sucessivos, baixo custo de produção e a comercialização segura. Para obtenção de plantas com elevado poder de comercialização, é muito importante a produção de mudas vigorosas, por essa razão os produtores têm buscado o emprego de metodologias que permitam a produção de mudas com características uniformes (MEDEIROS et al., 2007). Nesse contexto de busca por novas metodologias de produção, a utilização do extrato de microalgas se mostra como uma alternativa de grande valia que merece ser melhor avaliada.

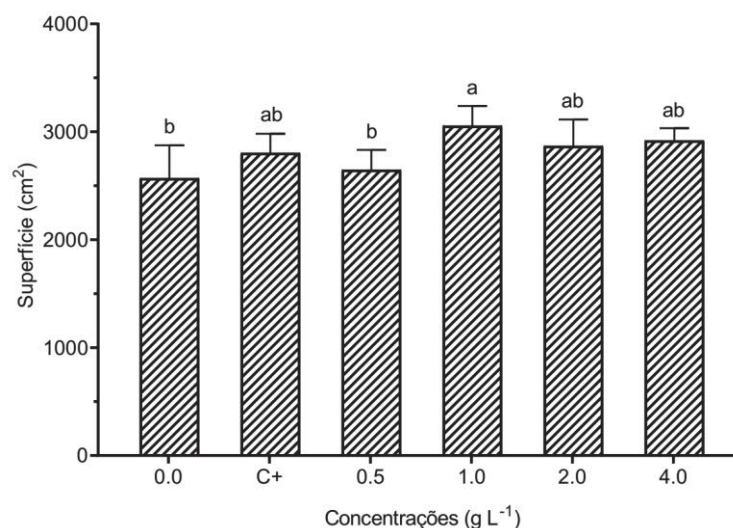
Por fim, foram realizados bioensaios para determinar a ação do extrato de *D. subspicatus* no crescimento de plantas de alface em estágio mais adiantado de desenvolvimento. Para tanto, mudas com 35 dias após a germinação foram transplantadas para vasos individuais e tratadas semanalmente com extrato aquoso até atingirem 70 dias de idade, quando foram avaliadas quanto o número de folhas, superfície e massa seca foliar (Figura 29).

FIGURA 29 - BIOENSAIO COM PLANTAS DE ALFACE EM VASOS INDIVIDUAIS TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



A determinação da superfície foliar das plantas de alface submetidas a aplicação do extrato aquoso apresentou a mesma tendência registrada nos bioensaios de germinação e produção de mudas, com o melhor resultado referente a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato, embora não exista diferença estatística entre esse tratamento e o controle positivo, ou mesmo as concentrações $2,0$ e $4,0 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 30).

FIGURA 30 - SUPERFÍCIE FOLIAR NAS PLANTAS ADULTAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO

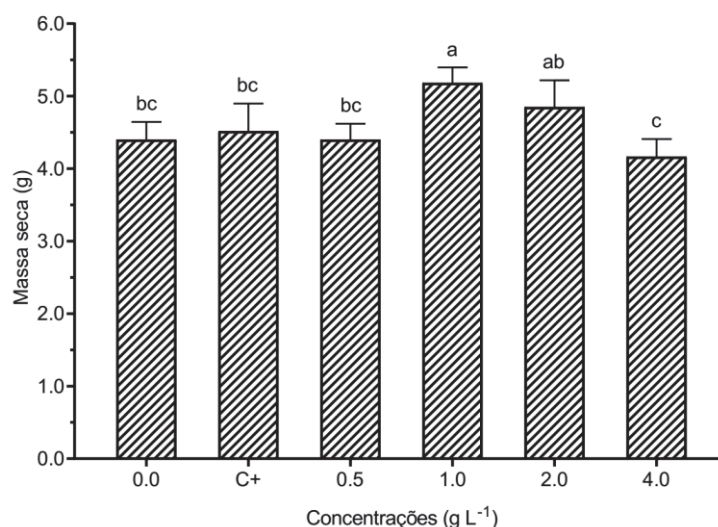


NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Apesar de a superfície foliar do melhor tratamento com extrato não diferir do tratamento controle positivo, o fato de ser significativamente melhor do que o controle negativo reforça a ação bioestimulante do extrato em promover o crescimento da parte

aérea das plantas de alface, reforçando os resultados dos bioensaios anteriores. Da mesma maneira, a massa seca foliar revela um perfil de resposta que indica novamente o tratamento com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato como o melhor resultado (Figura 31).

FIGURA 31 - MASSA SECA FOLIAR DAS PLANTAS ADULTAS DE ALFACE TRATADAS POR ASPERSÃO FOLIAR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

A escolha da alface como modelo de estudo se deu pela convergência de vantagens práticas como a aplicabilidade do extrato em uma cultura de amplo interesse comercial, facilidade de obtenção de sementes e mudas e rápido desenvolvimento do ciclo de vida, permitindo a avaliação das respostas relacionadas ao uso do extrato aquoso de *D. subspicatus* em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas.

Com base nos resultados dos bioensaios é possível identificar uma clara tendência de resposta morfológica demonstrada pelo maior desenvolvimento do hipocótilo e do sistema radicular (comprimento e massa seca) relativos aos tratamentos com maiores concentrações de extrato aquoso ($4,0 \text{ g L}^{-1}$). Ambos os resultados indicam a ação de compostos com capacidade de promoção da divisão e alongamento celular, funções tradicionalmente associadas à ação das auxinas. Entretanto, a metodologia de HPLC-MS utilizada para determinação de fitormônios no extrato não indicou a presença desse regulador vegetal. Ainda que não tenham sido detectadas a presença de auxinas, é importante destacar a complexidade da

composição do extrato utilizado, que certamente pode conter inúmeras outras moléculas como metabólitos secundários, aminoácidos, peptídeos e outros compostos aminados que podem resultar, isoladamente ou agindo de maneira conjunta, na resposta morfológica observada.

Quanto aos resultados referentes ao desenvolvimento do sistema foliar, os bioensaios também indicaram uma tendência de resposta associada às concentrações de extrato, sendo o melhor resultado sempre associado à concentração de 1,0 g L⁻¹. Diferente do sistema radicular, a resposta observada no maior crescimento das folhas pode ser associada diretamente à composição do extrato aquoso. Os resultados de HPLC-MS permitiram quantificar a presença da citocinina zeatina em aproximadamente 46 ng desse fitormônio por mg de extrato, além de indicar a presença de ácido abscísico em concentrações consideradas como traços. As citocininas tem como principal função fisiológica a promoção da divisão celular através da regulação da fase G1 do ciclo celular, controlando a atividade das enzimas quinases dependentes de ciclina (CDK), que são responsáveis pela regulação do ciclo celular em eucariontes. Enquanto as auxinas regulam a expressão do gene que codifica a maioria das CDKs, as citocininas ativam uma enzima similar à fosfatase que atua na remoção do grupamento fosfato da quinase promovendo sua ativação (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em relação ao ácido abscísico, embora tenha sido encontrado em baixas concentrações no extrato (abaixo do limite de quantificação pelo método utilizado), é possível que ainda produza efeitos fisiológicos sobre nas plantas dos bioensaios. O ABA é considerado um fitormônio inibidor do crescimento dos vegetais e apresenta sua síntese estimulada quando se faz necessária uma parada no crescimento da planta, estando envolvido em diversas respostas a estresses ambientais. Apesar de estar mais fortemente associado a mecanismos inibitórios, o ABA também pode exercer funções diferentes no crescimento das raízes e da parte aérea das plantas, uma vez que em condições adequadas de fornecimento de água ele pode promover o crescimento da parte aérea por inibir a produção de etileno. Por outro lado, em condições de estresse hídrico, altos níveis desse hormônio reduzem a síntese de etileno promovendo o crescimento da raiz e um leve efeito negativo no crescimento da parte aérea (FREITAS, 2009).

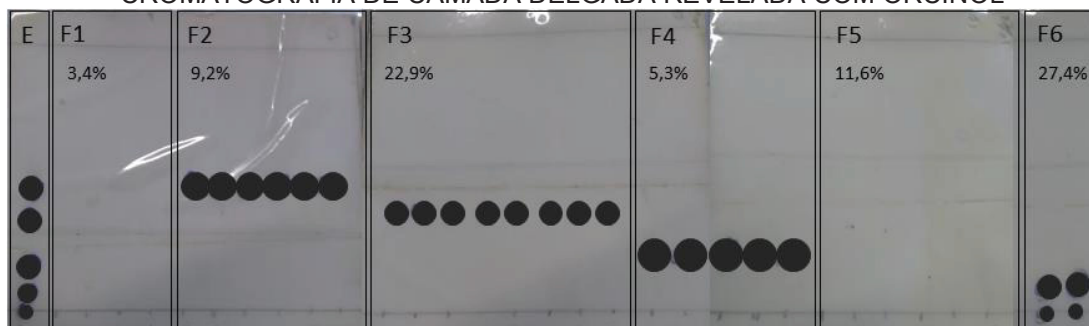
Os resultados de crescimento da parte aérea nos diferentes bioensaios podem indicar que existe uma razão ótima entre a zeatina e o ácido abscísico presentes no extrato aquoso de *D. subspicatus*, correspondendo à concentração de extrato aquoso igual a 1,0 g L⁻¹. Em concentrações menores, a zeatina presente não possuiria efeito promotor do crescimento, e em concentrações maiores o excesso de ácido abscísico poderia inibir o crescimento do sistema foliar. Outro ponto que merece ser destacado é que o fertilizante foliar comercial utilizado como controle positivo nos experimentos de produção de mudas e aplicação em plantas de alface apresenta em sua composição traços de di-hidrozeatina e cinetina, o que respalda o papel promotor das citocininas no desenvolvimento do sistema foliar das plantas em análise.

Além dos fitormônios presentes no extrato, as análises de RMN de ¹³C indicaram a presença dos glicosídeos mono e digalactosil-glicerol e sulfoquinovosil-glicerol, além dos monossacarídeos glucose, galactose e manose. Apesar de não serem moléculas normalmente associadas com atividade bioestimulante vegetal existem dados na literatura que os associam a determinadas respostas frente aos estresses abióticos.

Uma vez que os bioensaios indicam a possibilidade de um efeito sinérgico dos componentes do extrato aquoso nas respostas observadas, foi realizado o fracionamento do extrato em coluna de sílica gel em escala preparativa, com o objetivo de obter frações com composição mais homogênea e avaliar os efeitos de seus constituintes de maneira isolada. O fracionamento dos compostos presentes no extrato aquoso depende da sua polaridade e de suas interações com a fase estacionária (sílica gel) e fase móvel (mistura de solventes com diferentes polaridades – acetato de etila, metanol, água 8:2:1 v v⁻¹).

Como marcador mais objetivo da efetividade da separação dos compostos do extrato foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography* - TLC) para determinação dos glicosídeos e monossacarídeos presentes. O material recuperado da coluna representa 79% da massa do extrato (E) e resultou na obtenção de 6 frações, denominadas de F1, F2, F3, F4, F5 e F6. A Figura 32 ilustra avaliação dos carboidratos das frações em TLC e seus respectivos rendimentos.

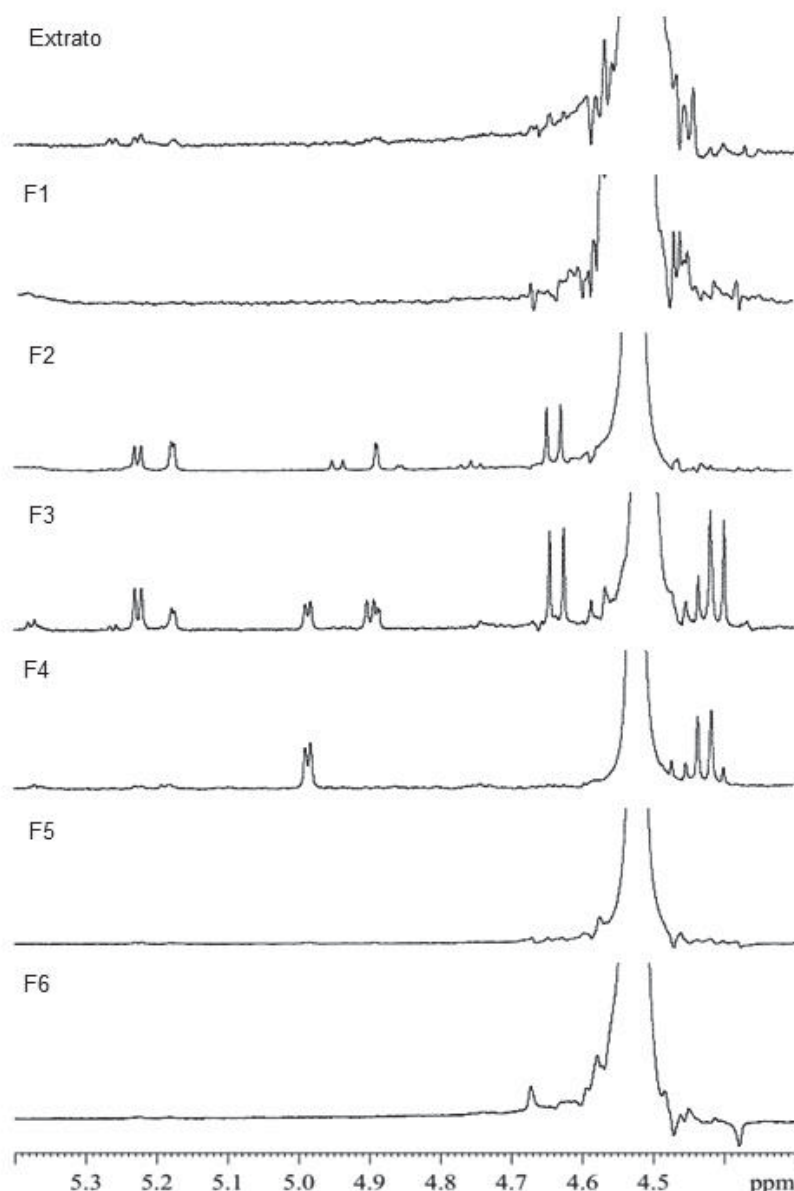
FIGURA 32 - AVALIAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA REVELADA COM ORCINOL



LEGENDA: E- extrato aquoso; F1 – fração 1; F2 – fração 2; F3 – fração 3; F4 – fração 4; F5 – fração 5; F6 – fração 6

Uma análise qualitativa da Figura 32 indica a efetividade da metodologia de separação dos carboidratos presentes no extrato em diferentes frações, entretanto, a confirmação da composição dos glicosídeos e monossacarídeos presentes nas frações necessita de metodologias analíticas mais refinadas. Para essa finalidade as frações foram analisadas por RMN de ^1H e comparadas com os assinalamentos descritos por Mazepa (2013), Oliveira (2017) e aos encontrados na literatura. A Figura 33 apresenta a região anomérica dos espectros de ^1H do extrato e das frações F1, F2, F3, F4, F5 F6.

Apesar de existirem em baixas concentrações no extrato e por isso resultarem em sinais de baixa intensidade, as análises de RMN ^1H e ^{13}C permitem indicar a presença de diferentes glicosídeos e monossacarídeos no extrato aquoso que podem ser encontrados nas diferentes frações obtidas. Os espectros das regiões anoméricas das frações F1 e F5 não apresentam sinais referentes a carboidratos, corroborando os resultados qualitativos observados na Figura 32. Nas demais frações, a presença de unidades monossacarídicas com anomeridade α e β pode ser identificada pela constante de acoplamento (J) entre H-1 e H-2 ($J_{1,2}$) das unidades monossacarídicas. De acordo com Bubb (2003) constantes de acoplamento entre 7,0 e 9,0 Hz indicam a presença de acoplamento diaxial associado à conformação β , enquanto constantes de acoplamento entre 2,0 e 4,0 Hz indicam acoplamento equatorial-axial referente a configuração α .

FIGURA 33 - RMN DE ^1H DO EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS EM COLUNA DE SÍLICA

A fração F2 apresenta sinais em 5,22 ppm com $J_{1,2} = 3,7$ Hz que pode ser associado à presença de uma unidade de $\alpha\text{-D-Glcp}$; 5,18 ppm com $J_{1,2} = 1,6$ Hz que indica a presença de unidades de $\alpha\text{-D-Manp}$; em 4,89 com $J_{1,2} = 1,0$ Hz que indica acoplamento axial equatorial típico de unidades de $\beta\text{-D-Manp}$; e em 4,63 ppm com $J_{1,2} = 7,9$ Hz indicando a presença de unidades de $\beta\text{-D-Glcp}$ (BUBB, 2003; OLIVEIRA, 2017).

A fração F3, além dos monossacarídeos $\alpha\text{-D-Glcp}$, $\beta\text{-D-Glcp}$ e $\alpha\text{-D-Manp}$ presentes na fração F2, apresenta sinais em 4,90 ppm com $J_{1,2} = 3,8$ Hz que indica a presença de unidade de $\alpha\text{-D-Sulfoquinovose-(1}\rightarrow$ do glicosídeo sulfoquinovosil-

glicerol; em 4,41 ppm com $J_{1,2} = 7,8$ Hz referente a unidades de β -D-Galp-(1 \rightarrow constituintes do glicosídeo monogalactosil-glicerol (SASSAKI et al., 1999; ARNOLD et al., 2015); além da presença de um sinal de baixa intensidade em 5,37 ppm com $J_{1,2} = 4,1$ Hz referente unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas indicando a presença de malto-oligossacarídeos (SASSAKI et al., 1999; RIZZI, 2010).

A fração F4 foi a mais homogênea dentre as frações que apresentaram sinais de H-1 referentes a carboidratos. O sinal em 4,43 ppm com $J_{1,2} = 7,8$ Hz e em 4,98 ppm com $J_{1,2} = 3,0$ Hz que indicam a presença de unidades de 6- β -D-Galp-(1 \rightarrow e α -D-Galp-(1 \rightarrow , respectivamente, evidenciando a presença do glicosídeo Digalactosil-glicerol (SASSAKI et al., 1999; ARNOLD et al., 2015).

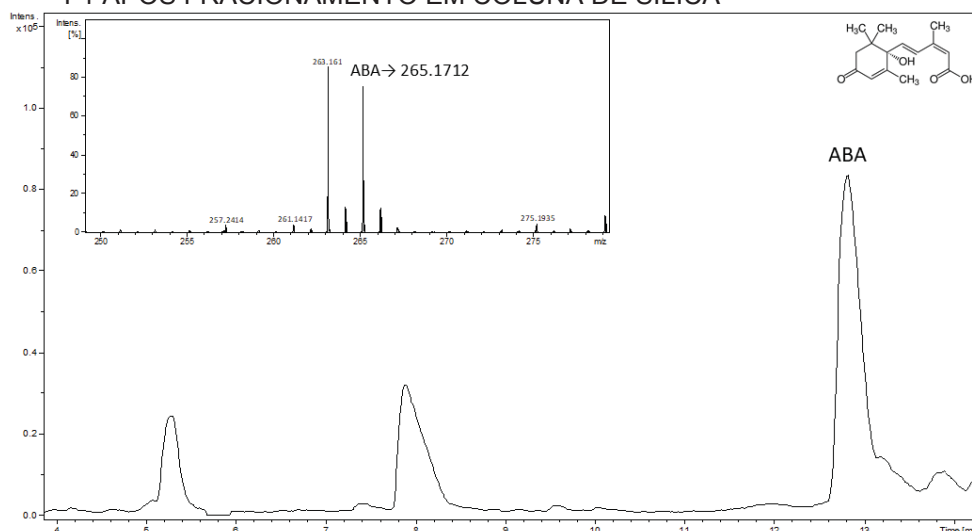
A fração F6 possui um sinal de baixa intensidade em 4,57 ppm que pode ser associado a presença de unidades monossacarídicas de β -D-Galactopiranosose (OLIVEIRA, 2017), além de um sinal em 4,67 ppm cuja origem não foi possível estabelecer. A Tabela 7 resume os resultados obtidos da análise das frações por RMN de ^1H .

Além das análises de RMN, as frações foram submetidas a análise em HPLC-MS para identificação dos fitormônios presentes. Embora tenha sido quantificada a presença de zeatina no extrato aquoso, sua ocorrência não verificada em nenhuma das frações obtidas. Por outro lado, o ácido abscísico que havia sido registrado apenas em concentrações traços no extrato aquoso foi identificado na fração F1 na concentração de 340 ng mg $^{-1}$ (Figura 34). Uma explicação possível para esse perfil de eluição na coluna de sílica está associada a fase móvel utilizada, composta por acetato de etila, metanol e água (8:2:1) que resultou na eluição do ácido abscísico logo no início do processo, enquanto a zeatina pode ter ficado associada ao resíduo que não foi adsorvido pela sílica.

TABELA 7 - ASSINALAMENTOS DE H-1 E $J_{1,2}$ NAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO OBTIDAS POR FRACIONAMENTO

Unidades	F1	F2	F3	F4	F5	F6
	^1H (ppm)	$J_{1,2}$ (Hz)	^1H (ppm)	$J_{1,2}$ (Hz)	^1H (ppm)	$J_{1,2}$ (Hz)
Sulfoquinovosil-glicerol						
α -D-Sulfoquinovose-(1 \rightarrow	-	-	4,90	-	-	-
Monogalactosil-glicerol						
β -D-Glactopiranosse-(1 \rightarrow	-	-	4,41	-	-	-
Digalactosil-glicerol						
6- β -D-Glactopiranosse-(1 \rightarrow	-	-	-	4,43	-	-
α -D-Glactopiranosse-(1 \rightarrow	-	-	-	4,98	-	-
Malto-oligosacarídeos						
4 \rightarrow)- α -Glucopiranosse	-	-	5,22	-	-	-
4 \rightarrow)- β -Glucopiranosse	-	-	4,63	-	-	-
4 \rightarrow)- α -Glucopiranosse-(1 \rightarrow	-	-	5,37	-	-	-
Monossacarídeos						
α -D-Glucopiranosse	-	5,22	3,7	-	-	-
β -D-Glucopiranosse	-	4,63	7,9	-	-	-
α -D-Galactopiranosse	-	-	-	-	-	4,57
α -D-Manopiranosse	-	5,18	1,6	-	-	2,8
β -D-Manopiranosse	-	4,89	1,0	-	-	-

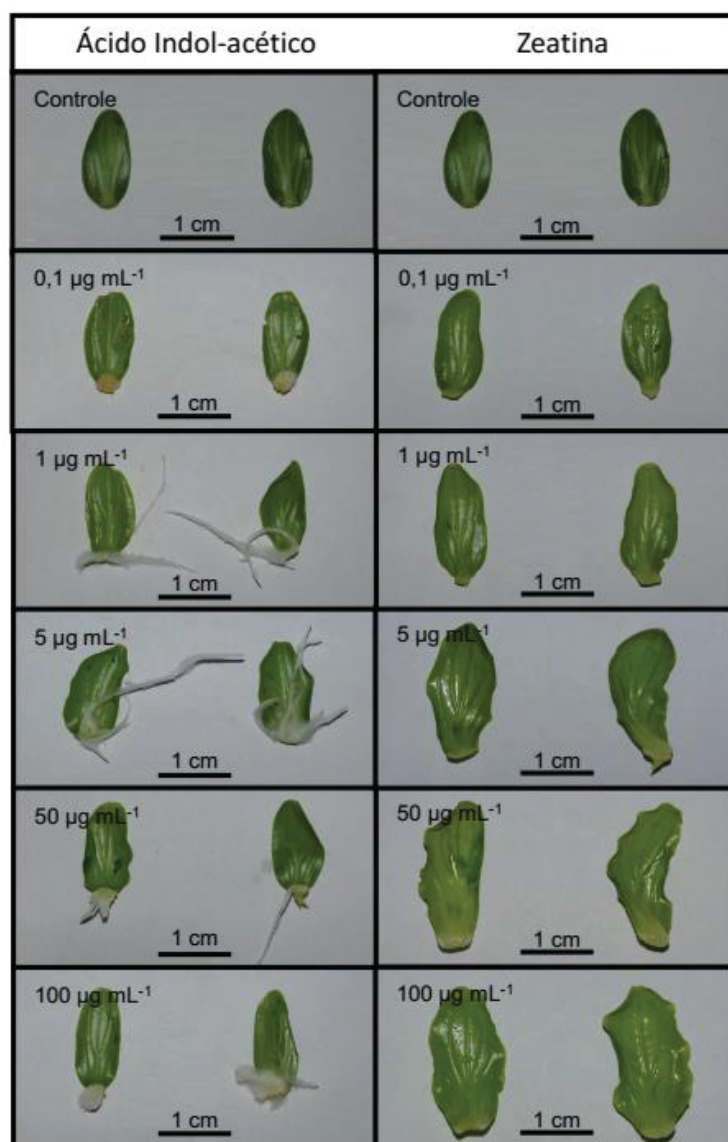
FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO E ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ABSCÍSICO NA FRAÇÃO F1 APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA



Com o objetivo de melhor elucidar a ação dos compostos presentes no extrato aquoso na atividade bioestimulante vegetal e compreender as respostas morfológicas observadas nos bioensaios anteriores, foram realizados novos experimentos para avaliar possíveis atividades auxínica e/ou citocinínica do extrato aquoso e suas frações. A metodologia utilizada consistiu em realizar a germinação de sementes de pepino sem a adição de qualquer composto exógeno para obtenção dos cotilédones recém germinados. Estes foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro e solução do extrato aquoso e das frações. Diferente dos bioensaios anteriores, nessa etapa não houve variação das concentrações testadas, sendo fixada em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ para todos os tratamentos. Para correlacionar as respostas morfológicas observadas nos tratamentos com sua atividade fisiológica foram realizadas bioensaios de referência com diferentes concentrações de zeatina e ácido indol acético.

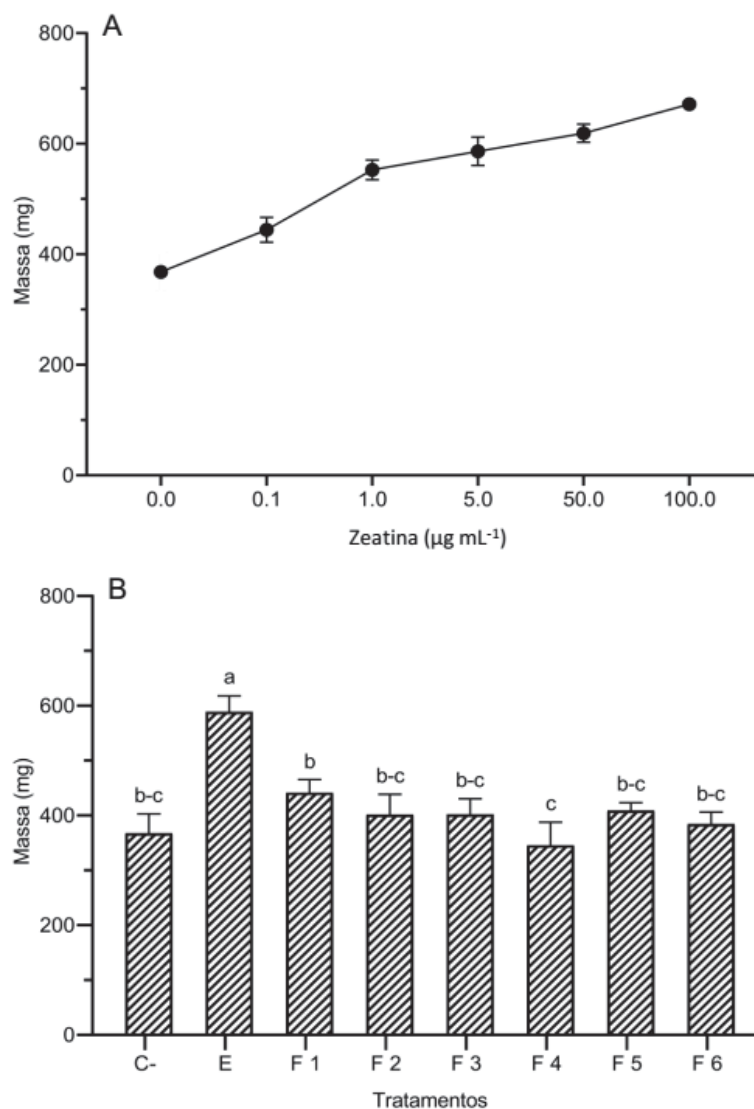
A Figura 35 apresenta as respostas morfológicas de produção e crescimento de raízes em cotilédones de pepino quando utilizadas soluções de concentração crescente de ácido indol acético. De maneira análoga, são apresentadas em conjunto as respostas de divisão e crescimento celular obtidas pela utilização de concentrações crescentes de zeatina. Ambos os bioensaios foram realizados com concentrações variando de $0,1$ a $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ do seu respectivo regulador vegetal.

FIGURA 35 - BIOENSAIOS DE REFERÊNCIA PARA ATIVIDADE AUXÍNICA E CITOCINÍNICA UTILIZANDO COTILÉDONES DE PEPINO



A Figura 36-A apresenta a curva de resposta de atividade citocinínica utilizando zeatina como fitormônio de referência. É possível notar um padrão linear crescente da massa fresca dos cotilédones que está relacionado com as concentrações de zeatina utilizadas. Na concentração mais baixa ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) a média da massa dos cotilédones foi de 444 mg, enquanto para a maior concentração ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a massa dos cotilédones foi de 671 mg.

FIGURA 36 - CURVA DE REFERÊNCIA DE ZEATINA E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE CITOCINÍNICA EM COTILÉDONES DE PEPINO



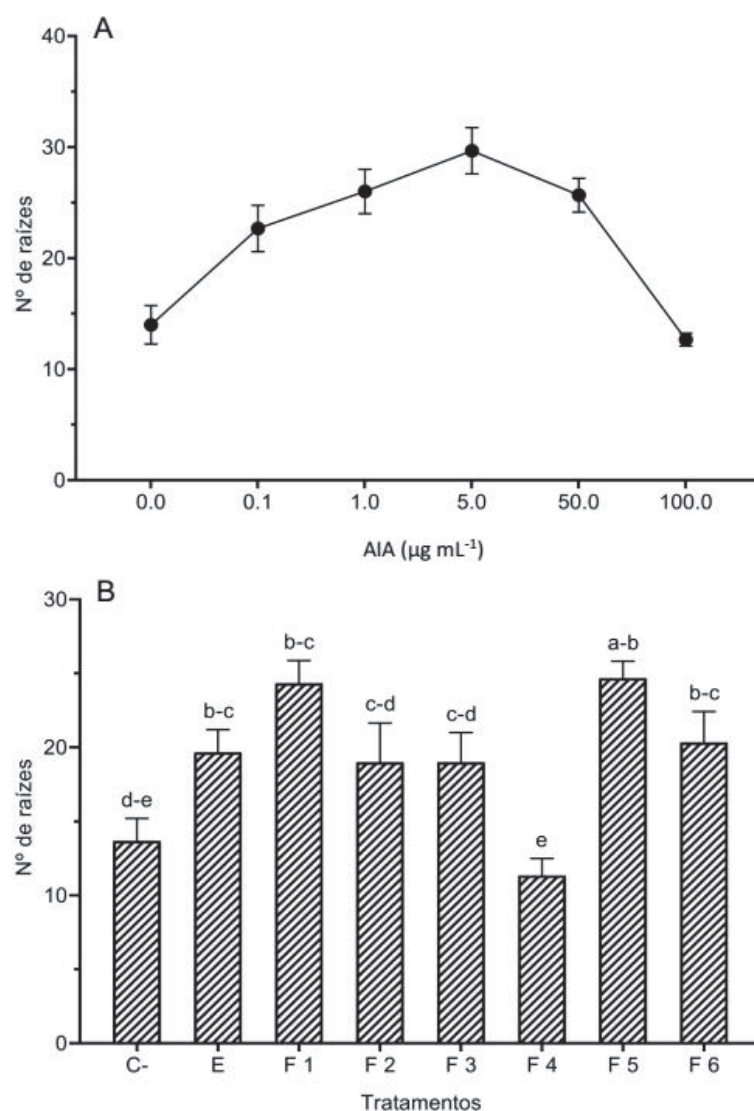
NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Dentre os bioensaios de atividade citocinínica realizados com o extrato aquoso e suas frações a melhor resposta de proliferação e crescimento celular foi observada na utilização do extrato aquoso “bruto”, com os cotilédones atingindo valor de biomassa fresca de 526 mg, enquanto todas as frações apresentaram resultados inferiores e não diferindo do tratamento controle (Figura 36-B). O resultado observado para o extrato aquoso é equivalente a concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de zeatina da curva de referência. Ainda que o extrato possua zeatina em sua composição, a quantidade desse fitormônio presente na solução de teste é aproximadamente 22 vezes menor do que seu equivalente, o que aponta para a presença de outros

compostos no extrato aquoso que sejam capazes de promover a divisão e crescimento celular, sendo esse processo independente da concentração de zeatina presente no meio. Esse resultado reforça a hipótese de que outros compostos do extrato possam agir de maneira sinérgica entre si resultando na atividade bioestimulante vegetal observada nesse trabalho e em seus antecessores.

Quanto a atividade auxínica, a curva de referência realizada com ácido-indol-acético apresenta na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ o ponto ótimo referente ao número de raízes emitidas pelos cotilédones (Figura 37-A), semelhante ao trabalho de Zhao et al. (1992).

FIGURA 37 - CURVA DE REFERÊNCIA DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE AUXÍNICA PARA NÚMERO E RAÍZES



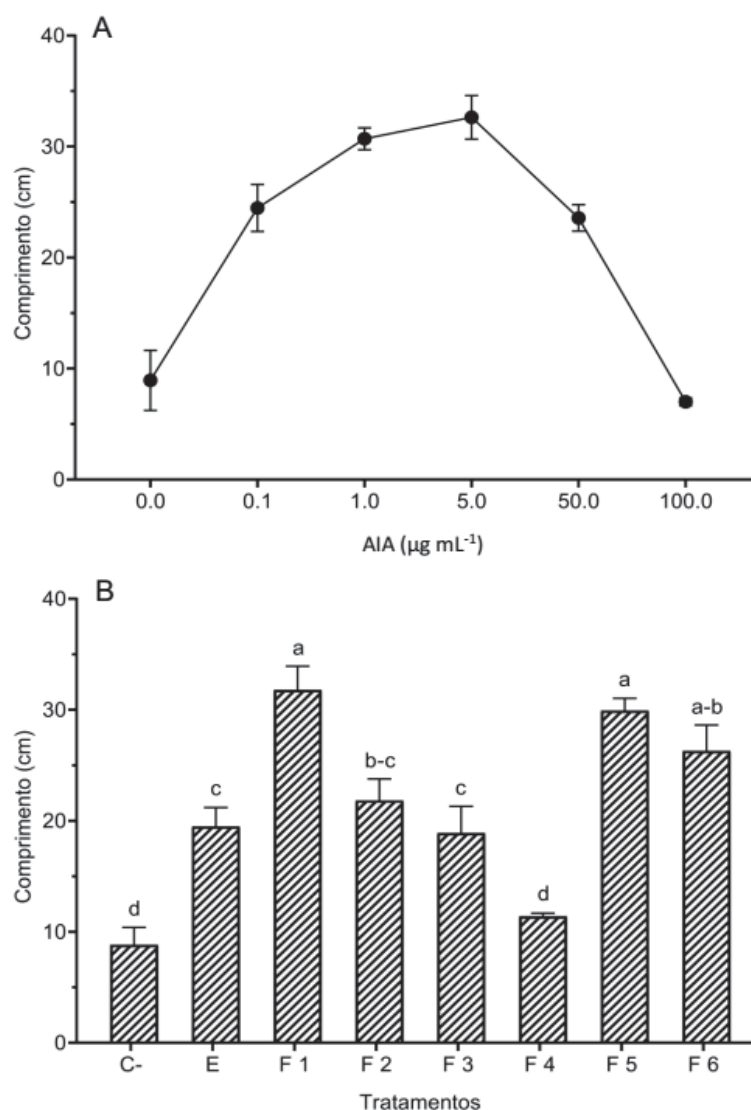
NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Os resultados dos bioensaios com o extrato aquoso e suas frações apresentaram um padrão de resposta muito diferente da atividade auxínica, com a fração F5 correspondendo ao melhor resultado de número de raízes, equivalendo às concentrações de 1,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido-indol-acético (Figura 37-B). Mesmo sendo o melhor resultado, a resposta observada para a fração F5 não difere significativamente das frações F1, F6 e do extrato “bruto”. Mais uma vez, a correlação desse padrão de resposta nos bioensaios com os dados de composição do extrato evidencia a ação conjunta de diferentes moléculas presentes no extrato de *D. subspicatus*.

Por fim, foi avaliado o comprimento total das raízes originadas dos cotilédones em cada tratamento. A Figura 38-A apresenta o perfil de resposta da curva de referência com AIA e permite concluir que assim como no bioensaio que avaliou o número de raízes, a concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou o melhor resultado. De maneira similar, os melhores resultados observados nos bioensaios com extrato aquoso e suas frações foram obtidos nas frações F1 e F5, não diferindo significativamente entre si e a fração F6 e se assemelhando a concentração 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na curva de referência (Figura 38-B).

As frações F1 e F5 não apresentaram glicosídeos e/ou monossacarídeos em sua composição, no entanto a fração F1 contém o ácido abscísico concentrado pelo processo de fracionamento por adsorção em coluna de sílica. Tradicionalmente o ABA está associado a processos de interrupção do desenvolvimento do vegetal, dormência de sementes, abscisão foliar, embora possa promover o crescimento de raízes em condições de estresse hídrico. Essa é uma explicação que satisfaz não somente o questionamento relativo aos bioensaios de atividade citocinínica, como também corrobora os resultados obtidos na etapa de germinação e produção de mudas de alface, quando foi observada a tendência de maior desenvolvimento do sistema radicular em maiores concentrações de extrato aquoso. Ainda que os relatos na literatura científica apontem o efeito positivo do ABA sobre o crescimento de raízes apenas em baixas concentrações, é possível que a ocorrência desse regulador em concentrações caracterizada como traços somente tenha efeito sobre o desenvolvimento das raízes da alface nos bioensaios quando aplicados em maiores quantidades, ou seja, nas maiores concentrações de extrato aquoso.

FIGURA 38 - CURVA DE REFERÊNCIA DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E BIOENSAIOS DE ATIVIDADE AUXÍNICA PARA COMPRIMENTO E RAÍZES

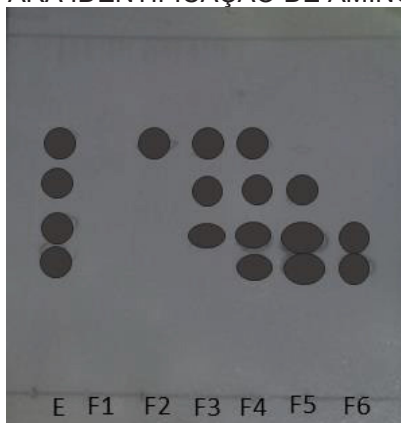


NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Com relação às frações F5 e F6, não foi identificada a presença de glicosídeos ou monossacarídeos que estejam associados a essa resposta morfológica no material vegetal. Da mesma forma, também não foi identificada a presença de nenhum dos reguladores vegetais testados. Entretanto, a fim de tentar esclarecer a origem da atividade auxínica dessas frações foi realizada uma análise em TLC com fase móvel composta por propanol e água (7:3) e revelada com ninidrina alcoólica para identificação de aminoácidos presentes nas frações. Apesar de ser um resultado de

caráter qualitativo, a Figura 39 permite identificar a presença aminoácidos presentes no extrato e suas frações.

FIGURA 39 - ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DO EXTRATO AQUOSO E SUAS FRAÇÕES PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS



NOTA: Revelador de ninhidrina em solução alcoólica

A análise de TLC não permitiu uma identificação precisa de quais aminoácidos compõem o extrato e suas frações, mesmo quando utilizados padrões específicos para essa finalidade a resolução não permitiu identificar os aminoácidos presentes. No entanto, essa análise preliminar permite conjecturar a função desses aminoácidos na atividade bioestimulante registrada, mais especificamente na atividade auxínica das frações F5 e F6.

Com base em todos os resultados de composição do extrato aquoso e das frações, aliados aos bioensaios realizados com diferentes modelos vegetais, é possível inferir que o padrão de resposta morfológica observado é dependente do balanço das concentrações e das diferentes interações entre os componentes presentes no meio, sendo possível a existência de uma atuação sinérgica entre fitormônios, glicosídeos e aminoácidos, além de outros compostos não avaliados.

5 CONCLUSÃO

A utilização da biomassa recuperada por floculação permitiu maior rendimento mássico na extração aquosa sem interferir negativamente nas características de composição macromolecular do extrato, mantendo equiparáveis os teores de proteínas e carboidratos totais, bem como os glicosídeos e monossacarídeos presentes. Esse resultado é de fundamental importância quando projetado o escalonamento do processo de produção de biomassa, uma vez que a floculação apresenta maior eficiência energética quando comparada a outros mecanismos de recuperação de biomassa microalgal.

O extrato aquoso de *Desmodemus subspicatus* apresenta potencial como bioestimulante vegetal de aplicação foliar, uma vez que gerou respostas morfológicas relacionadas ao desenvolvimento tanto do sistema foliar quanto do sistema radicular em plantas de alface avaliadas em diferentes estádios de desenvolvimento. A avaliação da composição do extrato aquoso indicou a presença da citocinina *trans*-zeatina e em concentrações mais baixas de ácido abscísico, dois fitormônios como funções fundamentais no desenvolvimento dos vegetais.

O fracionamento do extrato aquoso em coluna de sílica permitiu a obtenção de frações com composição distinta, associada à polaridade dos compostos presentes na mistura. A avaliação do extrato e dessas frações quanto sua capacidade de produzir respostas relacionadas a ação de citocininas e auxinas demonstrou que a complexidade da composição do extrato é mais importante para a determinação da atividade bioestimulante do que a ação dos seus componentes isoladamente. Esses resultados resultam numa hipótese que define a atividade bioestimulante vegetal do extrato de *Desmodemus subspicatus* como um produto das interações sinérgicas entre as diferentes classes de moléculas que os compõem.

REFERÊNCIAS

- ALGA ENERGY. Disponível em: <<http://www.algaenergy.es/en/sectors-products/agriculture-agrialgae/>>. Acesso em: 06 de Agosto de 2018.
- ALLGROW. Disponível em: <http://www.allgrow.net/how_it_works.html>. Acesso em: 06 de Agosto de 2018.
- ARNOLD, A. A.; GENARD, B.; ZITO, F.; TREMBLAY, R.; WARSCHAWSKI, D. E.; MARCOTTE, I. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 1, p. 369–377, 2015.
- BAJGUZ, A. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1946-1949, 2009.
- BATTACHARYYA, D.; BABGOHARI, M. Z.; RATHOR, P.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.
- BIORIZON. Disponível em: <<http://www.biorizon.eu/>>. Acesso em: 06 de Agosto de 2018.
- BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2003.
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3-41, 2014.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OGUIAR, N. A.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. *Extratos de algas e suas aplicações na agricultura*. Piracicaba: ESALQ, 2014.

CASTRO, P. R. C. **Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical**. Piracicaba: ESALQ, 2006.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001.

CHEN, Y.-H.; WEN, X.-W.; WANG, B.; NIE, P.-Y. Agricultural pollution and regulation: How to subsidize agriculture? **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 258-264, 2017.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J.S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

COLLA, G.; NARDI, S.; CARDARELLI, M.; ERTANI, A.; LUCINI, L.; CANAGUIER, M.; ROUPHAEL, Y. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 28-38, 2015.

COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; THOMAS, A. L.; ALBERTON, M. Comprimento e índice de expansão radical do hipocótilo de cultivares de soja. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 29, p. 609-612, 1999.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371-393, 2011.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. **How to feed the world in 2050**. Disponível em: <
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf>. Acesso em: 08 de Agosto de 2018.

FRANCO C. F.; PRADO, R. M. Nutrição de micronutrientes em mudas de goiabeira em resposta ao uso de soluções nutritivas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, p. 403-408, 2008.

Freitas, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. Salvador: EDUFBA, 2009

HALAT, L.; GALWAY, M. E.; GITTO, S.; GARBARY, D. J. Epidermal shedding in *Ascomyces nodosum* (Phaeophyceae): seasonality, productivity and relationship to harvesting. **Phycologia**, v. 54, n. 6, p. 599-608, 2015.

HANLEY, M. E.; FEGAN, E. L. Timing of cotyledon damage affects growth and flowering in mature plants. **Plant Cell Environment**, v. 30, p. 812-819, 2006

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – Brasil 2015**. Brasil: IBGE, 2015. Disponível em: <
<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>>. Acesso em: 08 de Abril de 2018.

JIE, M., RAZZA, W., XU, Y. C., SHEN, Q. -R. Preparation and Optimization of Amino Acid Chelated Micronutrient Fertilizer by Hydrolyzation of Chicken Waste Feathers and the Effects on Growth of Rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, p. 571-582, 2008.

JIRÁSKOVÁ, D.; POULÍČKOVÁ, A.; NOVÁK, O.; SEDLÁKOVÁ, K.; HRADECKÁ, V.; STRNAD, M. High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 1, p. 108–118, 2009.

LARROSA, A. P. Q.; CAMARA, A. S.; POHNDORF, R. S.; ROCHA, S. F.; PINTO, L. A. A. Physicochemical, biochemical, and thermal properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass dried in spouted bed at different conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1019-1029, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, Y.; TARKOWSKÁ D.; TURECKOVA, V.; LUO, T.; XIN, Y.; LI, J.; WANG, Q.; JIAO, N.; STRNAD, M.; XU, J. Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. **The Plant Journal**, v. 80, p. 52-68, 2014.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273-282, 2015.

MAZEPA, E. **Potencial atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da microalga *Scenedesmus subspicatus***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2013.

MEDEIROS, D. C.; LIMA, B. A. B.; BARBOSA, M. R.; DOS ANJOS, R. S. B.; BORGES, R. D.; CAVALCANTE NETO, J. G.; MARQUES, L. F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura brasileira**, v. 25, p. 433-436, 2007.

MOELLERING, E. R.; BENNING, C. Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 98-107, 2011.

MÓGOR, A. F.; ÖRDOG, V.; LIMA, G. P. P.; MOLNÁR, Z.; MÓGOR, G. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 453-460, 2018.

MORAES, J. G. V. **Biofertilizantes: identificação das barreiras regulatórias e propostas para viabilizar esse insumo agrícola**. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Getúlio Vargas, Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2015.

NETO, D. D.; DARIO, G. J. A.; BARBIERI, A. P. P.; MARTIN, T. N. Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 371–379, 2014.

NOVAES, P.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C. Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 39, p. 31-137, 2016.

OLIVEIRA, A. C. **Cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* visando a atividade bioestimulante vegetal**. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2017.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the *Chlorophyta*. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 1, p. 88–95, 2004.

PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7159–7170, 2009.

POVH, J. A. **Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**. 115 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CUADRA, F. G.; ACIÉN, F. G.; CARRERAS, N. Benefits of

combining anaerobic digestion and amino acid extraction from microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 1-9, 2014.

RENGASAMY, K. R. R.; KULKARNI, M. G.; PAPENFUS, H. B.; STADEN, J. V. Quantification of plant growth biostimulants, phloroglucinol and eckol, in four commercial seaweed liquid fertilizers and some byproducts. *Algal Research*, v. 20, p. 57-60, 2016

RIOUX, L.-E.; TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 530-537, 2007.

SAA, S.; RIO, A. O.-D.; CASTRO, S.; BROWN, P.H. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-9, 2015.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 301-307, 2009.

SASSAKI, G. L., MACHADO, M. J., TISCHER, C. A., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 844-847, 1999.

SCAGLIA, B.; POGNANI, M.; ADANI, F. The anaerobic digestion process capability to produce biostimulant: the case study of the dissolved organic matter (DOM) vs. auxin-like property. *Science of The Total Environment*, v. 589, p. 36-45, 2017.

SEELEY, R. H.; SCHLESINGER, W. H. Sustainable seaweed cutting? The rockweed (*Ascophyllum nodosum*) industry of Maine and the Maritime Provinces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1249, n. 1, p. 84-103, 2012.

SPINELLI, F. FIORI, G.; NOFERINI, M.; SPROCATTI, M.; COSTA, G. Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 84, n.

6, p. 131-137, 2009.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 459–467, 2013a.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Flow of cytokinins through the environment. **Plant Growth Regulation**, v. 62, p. 101-116, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163-170, 2007.

TORRES, P.; NOVAES, P.; FERREIRA, L. G.; SANTOS, J. P.; MAZEPA, E.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CHOW, F.; DOS SANTOS, D. Y. A. C. Effects of extracts and isolated molecules of two species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) on early growth of lettuce. **Algal Research**, v. 32, p. 142-149, 2018.

UDVARDI, M.; BRODIE, E. L.; RILEY, W.; KAEPPLE, S.; LYNCH, J. Impacts of Agricultural Nitrogen on the Environment and Strategies to Reduce these Impacts. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, p. 303, 2015.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, p. 8505-8517, 2017.

ZHANG H.; ZHOU D.; MATTHEW C.; WANG P.; ZHENG W. Photosynthetic contribution of cotyledons to early seedling development in *Cynoglossum divaricatum* and *Amaranthus retroflexus*. **New Zealand Journal of Botany** v. 46, p. 39-48, 2008.

ZHANG, S. S.; LIU, H.; YU, H. Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* with domestic secondary effluent and energy evaluation for biodiesel production. **Environmental technology**, v. 36, p. 1-8, 2015.

ZHAO, Z. R.; WU Z. L.; HUANG G. Q.; LI G. R. An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 209-213, 1992.

**CAPÍTULO 4: EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* COMO
ADITIVO NO MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA *IN*
VITRO E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri***

1 INTRODUÇÃO

Devido ao seu valor ornamental as orquídeas apresentam grande importância econômica, movimentando milhões de dólares anualmente. Esse interesse comercial resulta na pressão ecológica sobre as espécies ocasionada pela sobre exploração na natureza, podendo ocasionar a extinção de espécies mais sensíveis.

A germinação assimbiótica *in vitro* de orquídeas é uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem aumento da produtividade para atender ao mercado de flores de corte, bem como podem oportunizar novas estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção, através da reprodução *in vitro* e posterior reintrodução na natureza. Por essa razão, a utilização de compostos de origem natural que possam ser utilizados como aditivos ao meio de cultura se mostram como alternativas que devem ser melhor exploradas. Vários trabalhos evidenciaram a utilização de água de coco, extratos vegetais como aditivos ao meio de cultura. Entretanto, extratos de microalgas ainda não foram utilizados para essa finalidade, o que caracteriza uma oportunidade de aliar seu potencial bioestimulante a um novo nicho biotecnológico de desenvolvimento a ser explorado.

A escolha do modelo vegetal se deu por uma conjunção de fatores que agregam a sensibilidade de técnicas de propagação *in vitro*, onde é possível controlar variáveis imprescindíveis ao desenvolvimento dos vegetais como a disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento; com a aplicabilidade de técnicas que permitem a obtenção de elevado número de plantas. Em suma, buscou-se um modelo que pudesse unir a investigação dos efeitos fisiológicos da adição dos extratos, aliado à sua aplicação para o desenvolvimento de novos protocolos de propagação de orquídeas de grande interesse comercial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A orquídea epífita *Cattleya warneri* é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, de ocorrência nas regiões entre os estados da Bahia e Rio de Janeiro, que possui elevado interesse comercial. Por apresentar grande beleza ornamental de suas

flores, é intensamente coletada na natureza, o que lhe confere status de espécie vulnerável (BARROS et al., 2015).

Um dos fatores que contribui para o status de vulnerabilidade das orquídeas são suas características reprodutivas, que incluem a formação de sementes microscópicas que não apresentam tecido de reserva para nutrição embrionária, o que resulta na necessidade de interações com fungos micorrízicos para promover sua germinação (GUPTA, 2016). Em função dessas características reprodutivas, propagação *in vitro* de orquídeas é uma alternativa eficiente para produção de mudas, permitindo um maior número de plântulas e acelerando assim o processo de produção, o seu desenvolvimento ocorre mais rapidamente e fornecem mudas de melhor qualidade, mais uniformes e livres de doenças. (SCHNEIDER et al., 2014).

Na germinação assimbiótica, as sementes são colocadas em meios de cultura contendo os macro e micronutrientes necessários ao seu desenvolvimento, bem como vitaminas e uma fonte de carbono orgânico para nutrição do embrião. Após a germinação, formam-se os protocormos que posteriormente irão formar a plântula (YEUNG, 2017). Os protocolos de germinação e produção de mudas dependem de meios de cultura específicos, muitas vezes dependendo da adição de reguladores vegetais sintéticos, o que torna os procedimentos muito onerosos financeiramente. Nesse contexto, as microalgas representam uma nova opção de suplemento alternativo composição do meio de cultura.

Pereira et al. (2018) testaram o efeito da adição da microalga *Chlorella sorokiniana*, no meio de cultura WPM, suplementado com BAP e AIB e verificaram a influência na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*. Para a indução de brotos foi recomendado o meio suplementado somente com 22,19 µM de BAP, enquanto a adição de 12,26 µM de AIB com extrato de microalgas estimulou o enraizamento *in vitro*. Além dos fitormônios, as microalgas produzem outros compostos aminados que podem influenciar no crescimento e desenvolvimento de plantas. (CAZZANIGA et al., 2014; BURCZYK et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus*

O extrato utilizado como aditivo no meio de cultura para propagação de *C. warneri* foi obtido da biomassa de *D. subspicatus* produzida em fotobiorreator sob condições fotoautotróficas durante 14 dias de cultivo e recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante. Como apresentado no capítulo 3, o extrato aquoso contém aproximadamente 16,5% de proteínas, 22% de carboidratos e cerca de 33% de sais inorgânicos. Análises de RMN ^{13}C indicaram a presença de unidades monossacarídicas de glucose, galactose e manose, além da presença dos glicosídeos sulfoquinovosil-glicerol, monogalactosil-glicerol e digalactosil-glicerol. O extrato contém ainda *trans*-zeatina na concentração de $45,8 \text{ ng mg}^{-1}$ e traços de ácido abscísico.

3.2 Germinação assimbiótica de orquídeas e produção de plântulas

O extrato aquoso de *D. subspicatus* foi utilizado como aditivo ao meio de cultivo para propagação de *Cattleya warneri* (Orchidaceae) em duas etapas experimentais sequenciais: Germinação assimbiótica *in vitro*; e posteriormente no crescimento de plântulas com sistema foliar e radicular desenvolvidos. As seções a seguir detalham as metodologias empregadas nos bioensaios com orquídeas.

3.2.1 Obtenção das sementes e teste de viabilidade

Plantas de *C. warneri* originárias da Coleção Científica “Frederico Carlos Hoehne”, Instituto de Botânica, São Paulo - Brasil, foram previamente selecionadas para polinização cruzada para obtenção das sementes usadas para germinação assimbiótica. O teste de viabilidade foi realizado de acordo com metodologia descrita por Suzuki *et al.* (2012) e consiste em pesar 10 mg de sementes em microtubos de 2 mL; adicionar 2 mL de solução aquosa de sacarose (10% m v⁻¹) e manter em temperatura ambiente e no escuro por 24 h; após esse período a solução de sacarose foi substituída por uma solução aquosa de tetrazólio (1% m v⁻¹) e incubada no escuro a 38 °C por 24 h. Para finalizar, a solução de tetrazólio foi descartada e substituída

por água destilada e as sementes foram analisadas sob estereomicroscópio óptico para determinar a viabilidade das sementes.

3.2.2 Desinfestação das sementes e meio de cultura

As sementes foram submetidas a um protocolo de desinfestação com hipoclorito de sódio 1% (v v⁻¹) por 10 minutos; decorrido esse tempo a solução foi descartada e foram realizadas cinco lavagens sequenciais com água destilada esterilizada em papel filtro autoclavado, a fim de garantir a ausência de contaminantes na cultura. Em todos os tratamentos foi utilizado meio de cultura MS/2, que consiste no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a concentração dos sais que compõem os macronutrientes reduzida pela metade (Tabela 8).

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA MS/2 COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	8,25 10 ⁻¹
KNO ₃	9,50 10 ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,20 10 ⁻¹
KH ₂ PO ₄	8,50 10 ⁻²
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,35 10 ⁻⁴
Micronutrientes	
KI	8,3 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	6,20 10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,23 10 ⁻²
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	2,50 10 ⁻⁴
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,50 10 ⁻⁵
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,50 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA	3,73 10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78 10 ⁻²
Vitaminas	
Ácido nicotínico	5,00 10 ⁻⁴
Piridoxina HCl	5,00 10 ⁻⁴
Tiamina	1,00 10 ⁻⁴
Glicina	2,00 10 ⁻³
Outros	
Mioinositol	1,00 10 ⁻¹
Sacarose	3,00 10 ¹
Ágar	7,00 10

3.2.3 Germinação assimbiótica

Após a determinação da viabilidade e desinfestação, as sementes de *C. warneri* foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS/2 com diferentes condições de cultivo: Controle (sem extrato) e cinco concentrações de extrato de *D. subspicatus* (0,5; 1; 2; 4; e 8 g L⁻¹). Foram distribuídas aproximadamente 800 sementes por placa, com oito repetições por tratamento. Em cada placa foram delimitadas três regiões contendo aproximadamente 100 sementes para acompanhamento da germinação e desenvolvimento dos protocormos. A germinação foi avaliada após 90 dias da semeadura, quando foram determinados os estádios de desenvolvimento dos protocormos; a massa seca; e os teores de fitormônios do material vegetal.

3.2.4 Produção de plântulas

Após os 90 dias da germinação, parte dos protocormos referentes a cada tratamento foi transplantada para frascos contendo meio de cultura e as mesmas concentrações de extrato, a fim de promover o crescimento das plântulas até formação de sistema foliar e radicular. Cada tratamento consistiu de 8 placas de Petri com 20 protocormos cada. Após 120 dias do transplântio as plântulas foram avaliadas quanto ao número e comprimento das folhas; número e comprimento das raízes; massa seca; e teores de fitormônios. Todos os bioensaios de propagação de orquídeas foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da UFPR.

3.3 Determinação dos fitormônios nos protocormos e plântulas produzidos *in vitro*

Os protocormos produzidos durante a etapa de germinação assimbiótica e as plântulas obtidas após o transplântio foram avaliados quando ao teor de reguladores vegetais endógenos, com o objetivo de correlacionar as respostas de morfogênese com as respostas fisiológicas. A extração dos fitormônios foi realizada seguindo metodologia adaptada de Großkinsky et al. (2014) que consiste na maceração do material vegetal em nitrogênio líquido e extração utilizando etanol 80% e separação

dos compostos por cartuchos de extração em fase sólida (SPE) para remoção de contaminantes da amostra.

Os extratos foram avaliados seguindo a mesma metodologia apresentada no Capítulo 3, que consiste na análise em cromatografia líquida e alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS). A correlação dos resultados dos extratos vegetais foi realizada comparando os tempos de retenção dos compostos com os padrões de fitormônios *trans*-zeatina, di-hidrozeatina, zeatina ribosídeo, cinetina, cinetina ribosídeo, benziladenina, benziladenosina, ácido giberélico, ácido indol acético e ácido abscísico.

3.4 Análise estatística

Como nos bioensaios anteriores, todos os parâmetros foram avaliados estatisticamente aplicando análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos. Dados com *p* valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 8 (version 8.0.2 graphpad software inc, 2010, San Diego, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com maior definição da composição do extrato aquoso, tendo definido as concentrações de macromoléculas como carboidratos e proteínas, presença de glicosídeos e reguladores vegetais, foram realizados bioensaios com a orquídea *Cattleya warneri* a fim de determinar a ação da adição do extrato no meio de cultura sobre os processos de germinação assimbiótica e produção de plântulas. Os resultados do teste do tetrazólio para determinação da viabilidade das sementes de *C. warneri* permitiu identificar três categorias de resposta: Sementes viáveis ($86 \pm 3\%$), caracterizadas pela intensa coloração avermelhada do embrião no interior da semente; Sementes inviáveis ($3 \pm 0,5\%$), caracterizadas pela ausência de pigmentação avermelhada no embrião, embora este seja visível; e Palha ($11 \pm 1\%$), caracterizadas pela ocorrência de apenas o tegumento externo da semente e pela ausência do embrião.

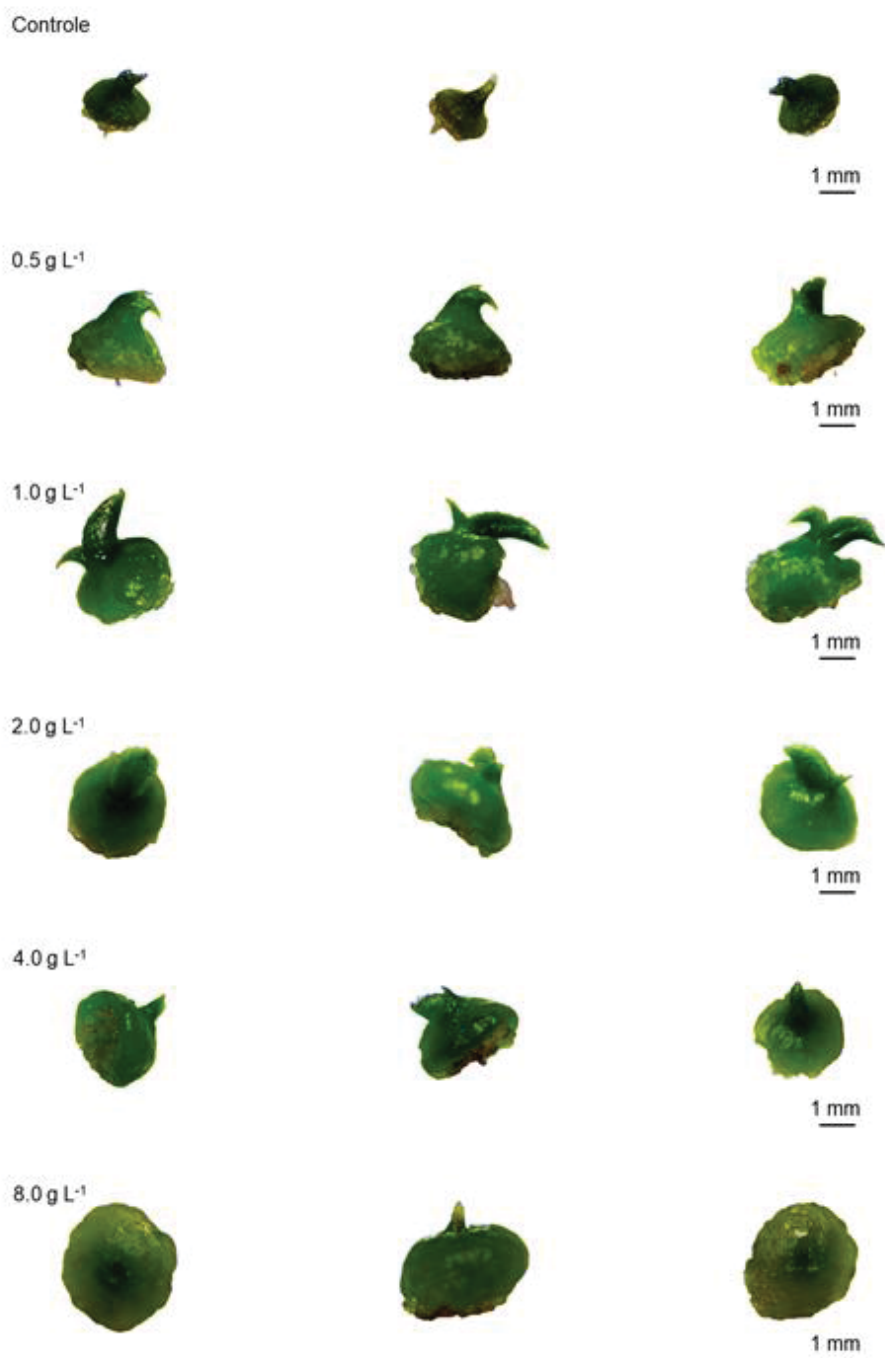
A determinação da viabilidade das sementes utilizadas nos protocolos de propagação de orquídeas é de fundamental importância, uma vez que as sementes são desprovidas de endosperma e os processos de germinação são mais exigentes quando comparados com outras espécies vegetais. O elevado percentual de viabilidade observado para as sementes de *C. warneri* indica que as metodologias de coleta e armazenamento das sementes foi adequado, o que permite avaliar de forma mais objetiva as respostas morfológicas e fisiológicas das plantas frente ao uso do extrato como aditivo no meio de cultura na germinação assimbiótica.

A germinação de sementes de orquídeas apresenta estádios de desenvolvimento específicos e bem definidos: Absorção de água e intumescimento das sementes; desenvolvimento de embrião clorofilado; rompimento da testa e exposição de um embrião globular; desenvolvimento do ápice foliar; e formação de folhas. De acordo com Jorge, Juras e Suzuki (2015) as sementes são consideradas germinadas ao apresentarem embrião intumescido, clorofilado e com a testa rompida. Decorridos 90 dias da semeadura todos os tratamentos foram considerados germinados, diferindo morfológicamente entre si pelo estágio de desenvolvimento. A Figura 40 ilustra as características morfológicas dos protocormos de *C. warneri* após 90 dias de semeadura.

Ao final do período de germinação, o tratamento controle (sem adição de extrato) apresentou protocormos clorofilados com presença de ápice foliar em início de desenvolvimento. Entretanto, quando comparado com os demais tratamentos, destaca-se a diferença de volume dos protocormos. Os tratamentos com 0,5 e 4,0 g L⁻¹ de extrato aquoso de *D. subspicatus* apresentaram protocormos com início de desenvolvimento de folhas. Qualitativamente, os tratamentos com 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de extrato apresentaram maior desenvolvimento, com protocormos com uma ou mais folhas desenvolvidas, diferindo dos demais tratamentos, ainda que o tratamento 1,0 g L⁻¹ tenha apresentado folhas mais bem desenvolvidas. O tratamento com maior concentração de extrato (8,0 g L⁻¹) foi o que apresentou menor desenvolvimento, com a formação de ápice foliar apenas, embora tenha apresentado maior volume entre todos os tratamentos.

Em síntese, uma análise qualitativa dos estádios de desenvolvimento dos protocormos após 90 dias de semeadura indica que a adição do extrato de *D. subspicatus* possui efeito promotor de crescimento na germinação assimbiótica de sementes de *C. warneri*, com maior desenvolvimento para concentração de 1,0 g L⁻¹ e inibição/retardamento do desenvolvimento para a maior concentração de extrato com 8,0 g L⁻¹. Os resultados referentes à germinação servem de indicativo da ação bioestimulante do extrato de *D. subspicatus* sobre os estádios iniciais de desenvolvimento das sementes de *C. warneri* germinadas *in vitro*.

FIGURA 40 - PROTOCORMOS PRODUZIDOS POR GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA APÓS 90 DIAS DE CULTIVO EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO

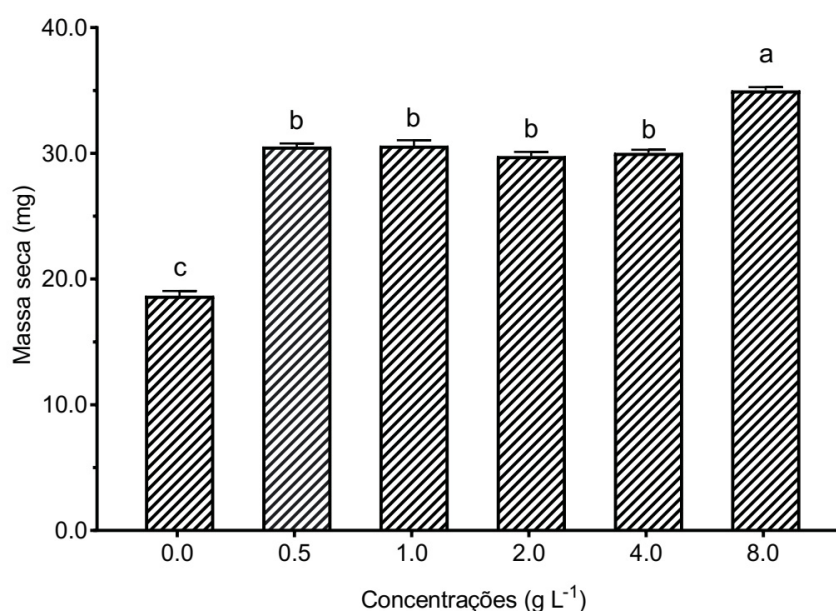


Os estádios de desenvolvimento observados no presente estudo são superiores aos observados por Jorge, Juras e Suzuki (2015), que descrevem a germinação de assimbiótica de *Cattleya warneri* em meio de cultura MS/2 e relatam que na avaliação de 90 dias foram registrados apenas protocormos intumescidos e clorofilados. Esse resultado indica que a utilização do extrato aquoso de *D.*

subspicatus como aditivo no meio de cultura para germinação assimbiótica da orquídea *C. warneri* promove a obtenção de plântulas mais bem desenvolvidas em intervalo de tempo menor do que os protocolos disponíveis na literatura científica.

Para complementar as análises de avaliação dos estádios de desenvolvimento das sementes germinadas, foi determinada a massa seca dos protocormos obtidos em cada tratamento ao final dos 90 dias de cultivo. A Figura 41 apresenta os resultados de massa seca para 100 protocormos de cada tratamento.

FIGURA 41 - MASSA SECA DE 100 PROTOCORMOS 90 DIAS APÓS GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

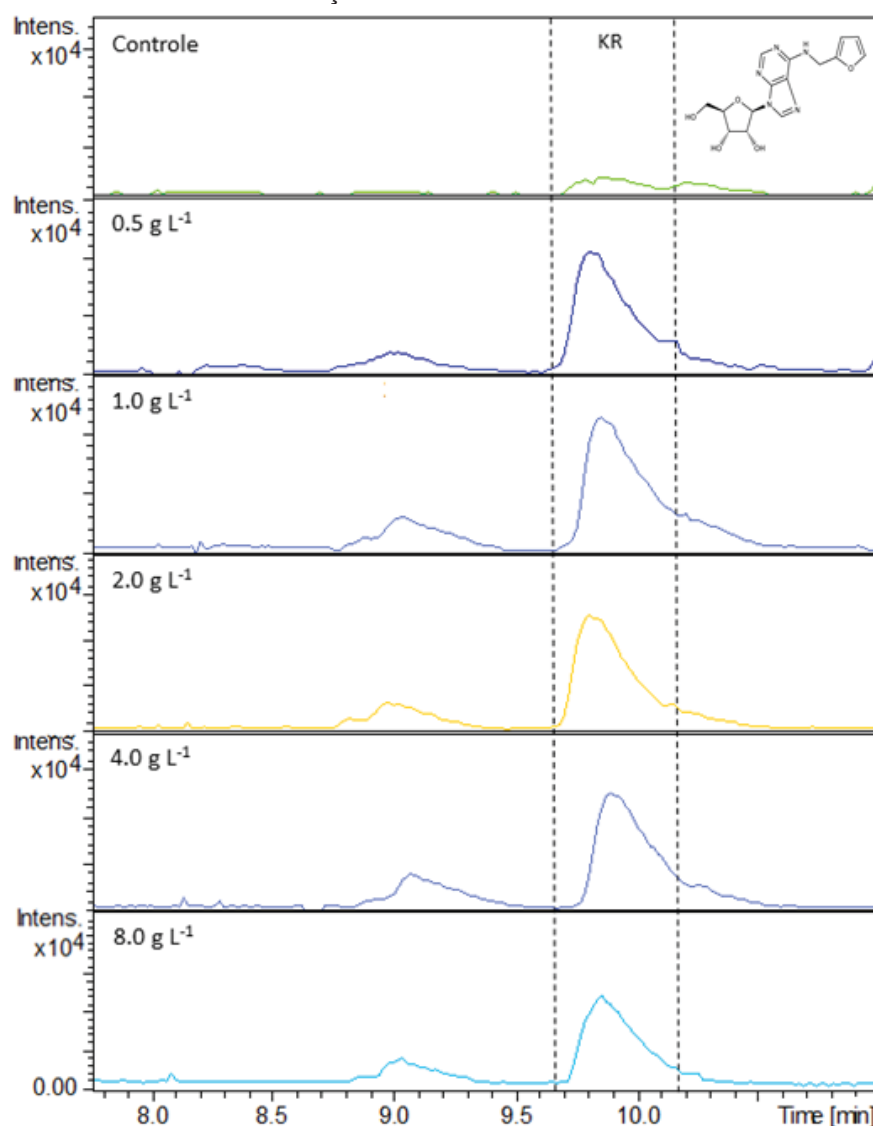
Os resultados da determinação da massa seca dos protocormos resultantes dos 90 dias de germinação assimbiótica refletem os resultados dos estádios de desenvolvimento e corroboram a avaliação qualitativa do volume dos protocormos. O tratamento com 8,0 g L⁻¹ de extrato aquoso apresentou maior massa seca dentre os demais; enquanto os tratamentos 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ não diferem significativamente entre si; e o tratamento controle sem adição de extrato aquoso apresentou o menor resultado de massa seca. Assim como na avaliação do desenvolvimento dos protocormos, a adição do extrato aquoso ao meio de cultura permitiu maior crescimento dos protocormos quando comparados ao controle. Vale

destacar que apesar de o tratamento com maior concentração de extrato ($8,0\text{g L}^{-1}$) não resultar em protocormos tão bem desenvolvidos como nas outras concentrações, permitiu o maior ganho de massa, resultando em aproximadamente o dobro da biomassa registrada no tratamento controle.

Os trabalhos que se dedicam a avaliação da germinação de orquídeas *in vitro* objetivam em sua maioria o desenvolvimento de protocolos para a propagação e obtenção de plântulas, por essa razão não foram encontrados resultados na literatura que permitissem uma comparação da biomassa dos protocormos sob efeito do extrato aquoso com outras condições de cultivo. Ainda assim, a correlação entre a avaliação dos estádios de desenvolvimento dos protocormos com a biomassa produzida permite inferir que a concentração de $1,0\text{ g L}^{-1}$ permite o equilíbrio entre a divisão celular e os processos de morfogênese.

A fim de avaliar a resposta fisiológica dos protocormos desenvolvidos na germinação em resposta a adição do extrato, foram realizadas extrações com solução etanólica ($80\% \text{ v v}^{-1}$) dos protocormos após 90 dias da semeadura para determinação dos fitormônios por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS). A análise permitiu identificar um composto com eluição em 9,8 min e através da comparação do tempo de retenção e dos espectros de massas dos reguladores vegetais utilizados para confecção da curva de referência foi possível identificar a presença da citocinina cinetina ribosídeo. Com base na avaliação dos extratos de cada tratamento é possível indicar que o tratamento controle não apresentou a presença dessa citocinina, enquanto os tratamentos contendo extrato da microalga *D. subspicatus* favoreceram a biossíntese de cinetina ribosídeo pelos protocormos em desenvolvimento durante a germinação assimbiótica (Figura 42).

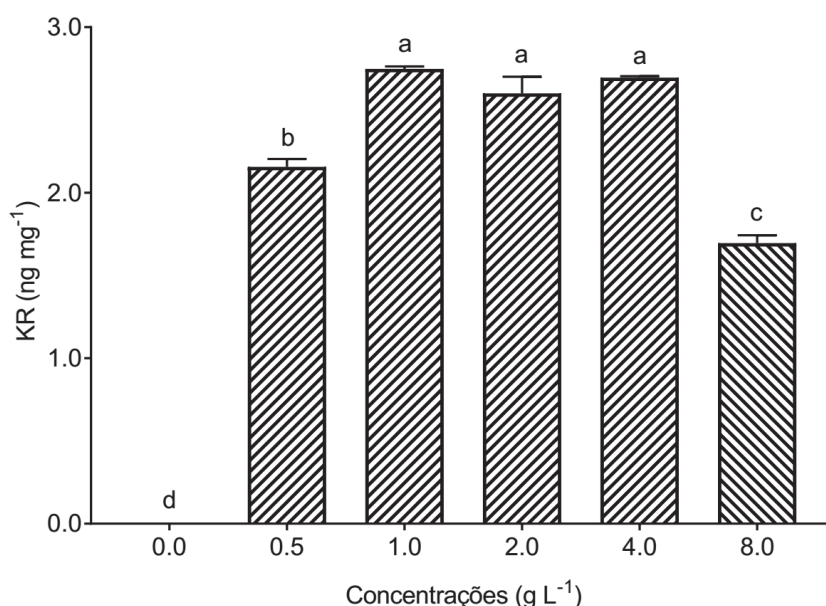
FIGURA 42 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CINETINA RIBOSÍDEO (KR) NOS PROTOCORMOS 90 DIAS APÓS GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA



Pintos et al. (2002) avaliaram os níveis de citocininas endógenas em explantes de pecíolo de *Medicago arborea* e em calos embriogênicos e não embriogênicos induzidos a partir de explantes de pecíolo e observaram a aplicação de citocininas exógenas induzia o aumento da síntese das citocininas endógenas após o primeiro mês de cultivo. Os autores argumentam que os processos de morfogênese, organogênese e embriogênese *in vitro* dependem do equilíbrio entre os reguladores aplicados externamente e os reguladores endógenos presentes no explante. Esses resultados auxiliam a explicar a ausência de cinetina ribosídeo no tratamento controle, sem aplicação da zeatina presente no extrato aquoso.

A quantificação de cinetina ribosídeo por HPLC-MS juntamente com os rendimentos da extração etanólica dos protocormos serviram para determinar a razão mássica dessa citocinina na biomassa vegetal. A Figura 43 apresenta os resultados da quantificação de cinetina ribosídeo nos protocormos produzidos por germinação assimbiótica de sementes de *C. warneri*.

FIGURA 43 - QUANTIFICAÇÃO DE CINETINA RIBOSÍDEO NOS PROTOCORMOS 90 DIAS APÓS GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA EM MEIO COM EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Com base na Figura 43 é possível destacar que os maiores teores de cinetina ribosídeo (KR) presentes na biomassa dos protocormos foram observados nas concentrações de 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ de extrato de microalgas, com aproximadamente 2,8 ng de KR por mg de biomassa vegetal, não diferindo significativamente entre si. Em seguida aparece o tratamento com 0,5 g L⁻¹ de extrato, com 2,0 ng mg⁻¹; e a concentração de 8,0 g L⁻¹ com 1,8 ng mg⁻¹. O tratamento controle foi o único a não apresentar conteúdo de cinetina ribosídeo no extrato etanólico obtido da biomassa dos protocormos.

As citocininas ocorrem de forma livre ou glicosiladas nos tecidos vegetais, como é o caso da cinetina ribosídeo, que está associada ao aumento da divisão celular, alongamento dos tecidos e formação de parte aérea (SAKAKIBARA, 2006).

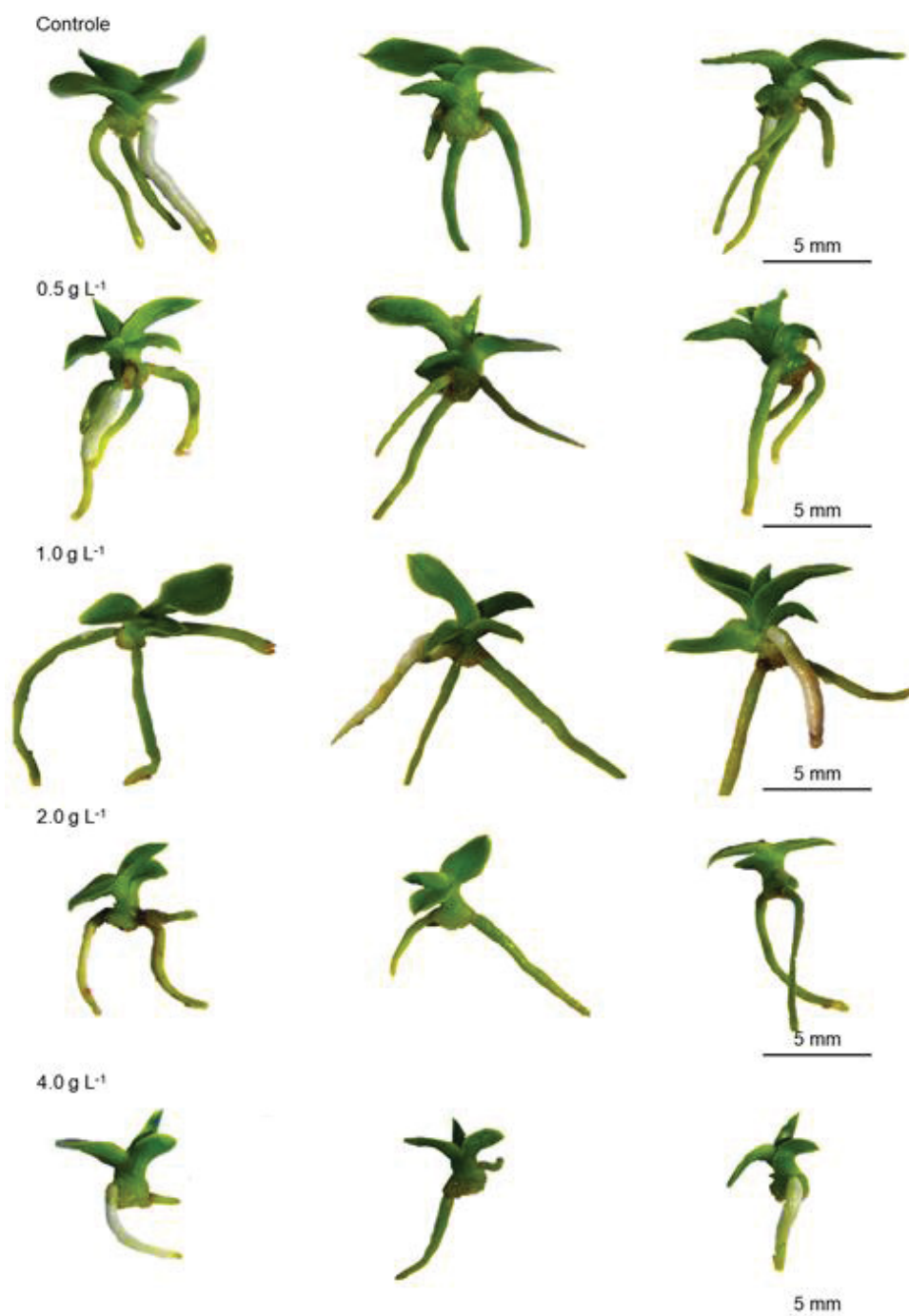
Os elevados teores de KR nos protocormos dos tratamentos com 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ quando comparados aos demais tratamentos podem explicar os resultados da avaliação dos estádios de desenvolvimento dos protocormos. Enquanto esses tratamentos apresentaram protocormos com folhas desenvolvidas, os demais tratamentos apresentaram apenas o surgimento dos ápices foliares. Como a KR é uma citocinina e tem papel nos processos de organogênese associados à parte aérea, é condizente a presença de maiores concentrações desse regulador nos protocormos mais desenvolvidos.

Como mencionado anteriormente, a maioria dos trabalhos científicos que avaliam a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas tem por objetivo o desenvolvimento de protocolos para obtenção de plântulas. Por essa razão, a literatura científica carece de dados relacionados à quantificação de fitormônios na biomassa vegetal resultante desses protocolos.

Sequencialmente à etapa de germinação assimbiótica e obtenção de protocormos com ápices foliares ou folhas desenvolvidas, os protocormos foram transplantados para novas placas de Petri contendo meio MS/2 nas mesmas condições de cultivo. Para essa etapa decidiu-se por excluir o tratamento com 8,0 g L⁻¹, uma vez que essa concentração retardou/inibiu o desenvolvimento dos protocormos. A etapa de transplântio teve por objetivo a produção de plântulas com sistema foliar e radicular plenamente desenvolvidos e teve duração de 120 dias de cultivo. Ao final desse período, as plântulas foram avaliadas quanto ao número e comprimento de folhas produzidas, número e comprimento de raízes, massa seca das plântulas e teor de fitormônios.

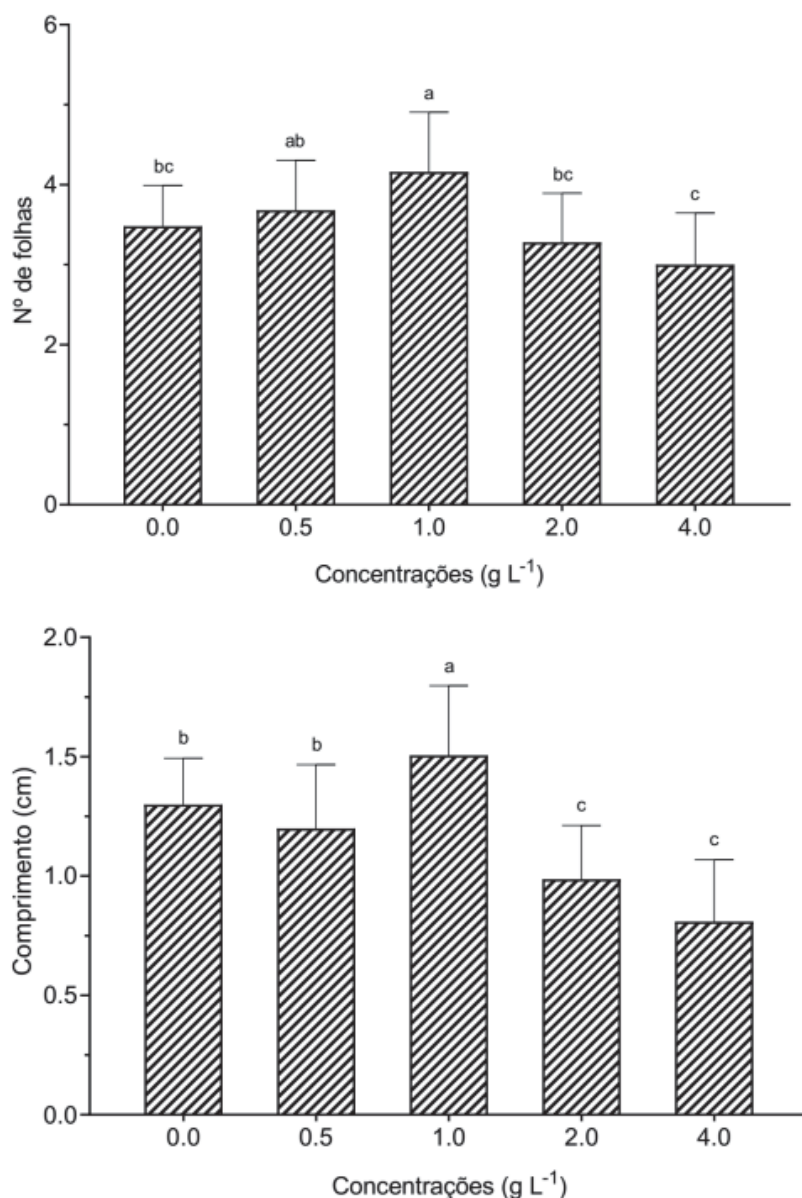
Todos os tratamentos produziram plântulas com folhas e raízes desenvolvidas, diferindo entre si pelo tamanho das plântulas, e pela complexidade dos sistemas foliar e radicular. Apesar de o tratamento controle ter produzido protocormos pouco desenvolvidos na etapa de germinação anterior ao transplântio, nessa etapa foram obtidas plântulas completas. Assim como o tratamento controle, os demais tratamentos com diferentes concentrações de extrato aquoso resultaram em plântulas com sistema foliar e radicular bem desenvolvido. A Figura 44 apresenta as características morfológicas das plântulas produzidas ao final dos 120 dias de cultivo.

FIGURA 44. PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS PRODUZIDAS APÓS TRANSPLANTIO DE 120 DIAS EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO



Quando avaliados os resultados referentes à formação do sistema foliar, é possível destacar que o tratamento com adição de 1,0 g L⁻¹ de extrato de microalgas resultou em plântulas com maior número de folhas e maior comprimento total de folhas dentre todos os tratamentos (Figura 45-A)

FIGURA 45 - NÚMERO E COMPRIMENTO DAS FOLHAS DAS PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO EM MEIO COM EXTRATO

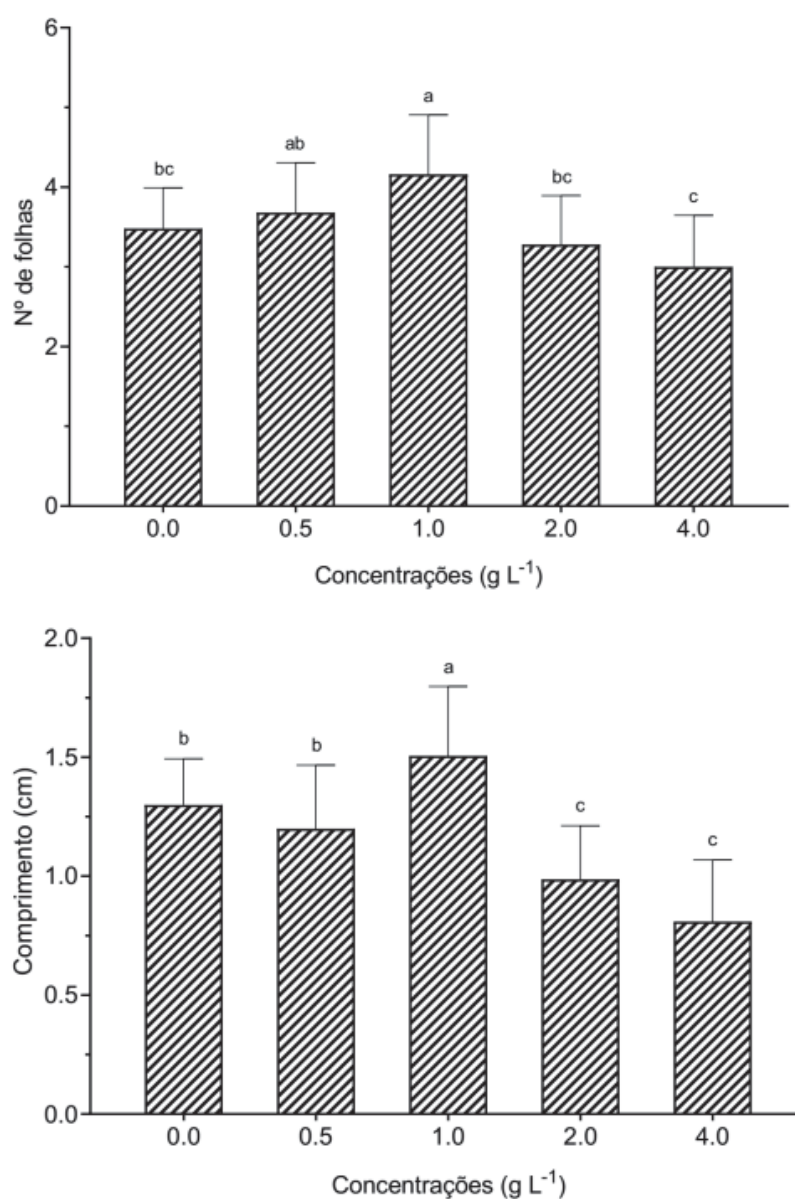


NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Com base nos resultados destacados na Figura 45-A nota-se o maior número de folhas por plântula registrado no tratamento com 1,0 g L⁻¹ ($4,16 \pm 0,7$), com diferença significativa em relação ao tratamento controle ($3,48 \pm 0,5$) e às demais concentrações de extrato, exceto para 0,5 g L⁻¹ ($3,68 \pm 0,6$). De maneira semelhante, quando comparados os resultados referentes ao comprimento total das folhas de cada plântula obtida nos diferentes tratamentos, é possível destacar a mesma tendência, com os melhores resultados referentes ao tratamento com 1,0 g L⁻¹ de extrato diferindo significativamente de todas as outras condições. Em seguida aparecem o tratamento

controle; 0,5; 2,0 e 4,0 g L⁻¹, respectivamente (Figura 45-B). Assim como observado na etapa de germinação assimbiótica, os tratamentos contendo maiores concentrações de extrato aquoso de *D. subspicatus* apresentaram algum grau de inibição no desenvolvimento do sistema foliar dos explantes. A avaliação do número de raízes formadas em cada plântula indica não haver diferença entre o tratamento controle e as menores concentrações de extrato (0,5 e 1,0 g L⁻¹), sendo estes os melhores resultados, seguidos das concentrações 2,0 e 4,0 g L⁻¹ (Figura 46-A)

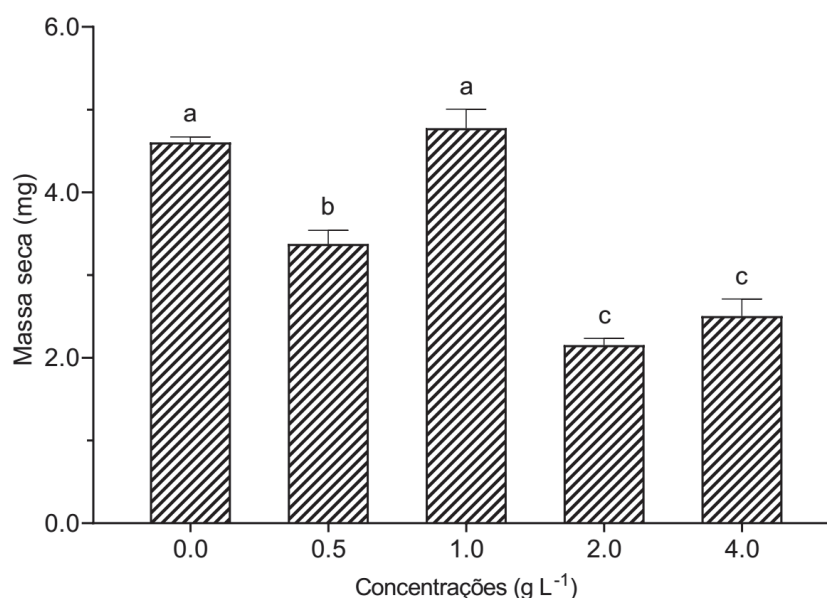
FIGURA 46 - NÚMERO E COMPRIMENTO DAS RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO EM MEIO COM EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

A avaliação da massa seca das plântulas obtidas ao final dos 120 dias de cultivo mostrou que os tratamentos controle e 1,0 g L⁻¹ não diferem significativamente um do outro, sendo estes os melhores resultados observados. Na sequência aparecem os tratamentos com 0,5; 2,0 e 4,0 g L⁻¹ de extrato de *D. subspicatus* no meio de cultura (Figura 47). Os dados de número e comprimento de folhas e raízes, juntamente os resultados da massa seca das plântulas permitem definir que o melhor tratamento foi 1,0 g L⁻¹, uma vez que permitiu o desenvolvimento de plântulas superiores aos demais tratamentos, sobretudo no que se refere à formação e desenvolvimento do sistema radicular.

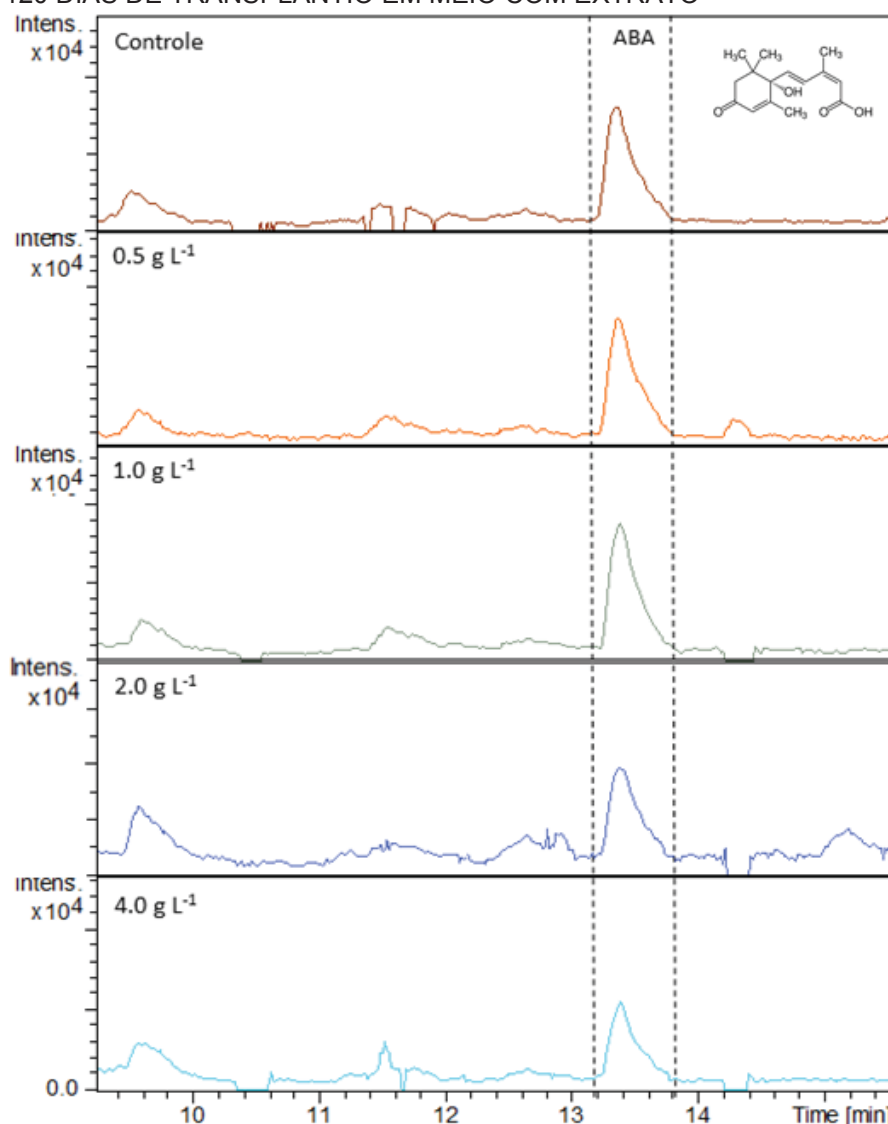
FIGURA 47 - MASSA SECA DAS PLÂNTULAS DE ORQUÍDEAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO EM MEIO COM EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

As plântulas foram ainda avaliadas quanto aos teores de fitormônios presentes em sua biomassa. De maneira similar ao observado na quantificação de fitormônios dos protocormos, foi possível identificar apenas um tipo de regulador vegetal, nesse caso o ácido abscísico. Para sua identificação foram comparados os perfis de eluição dos extratos de cada tratamento com a curva de referência, permitindo identificar a presença de ABA em 13,1 min de eluição em HPLC (Figura 48).

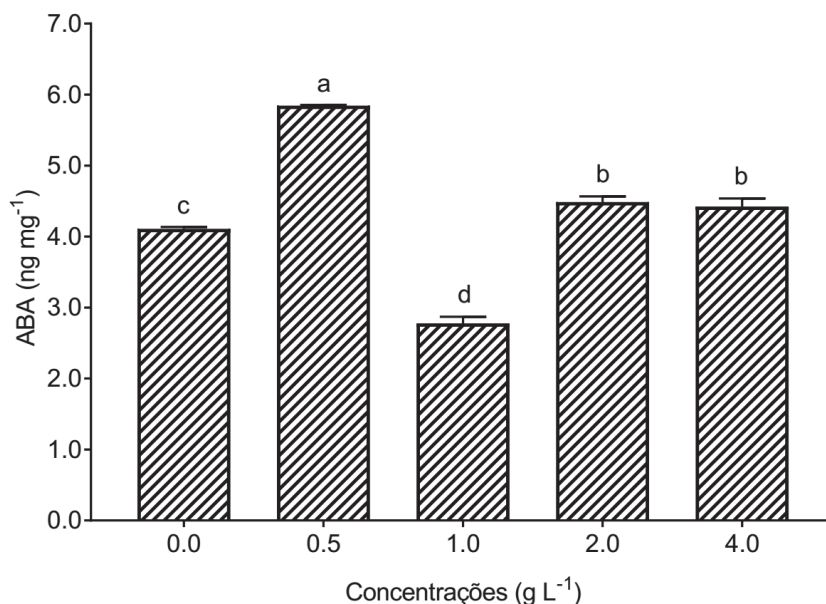
FIGURA 48 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) NAS PLÂNTULAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO EM MEIO COM EXTRATO



Diferente dos dados apresentados para a quantificação de reguladores endógenos nos protocormos, que mostraram a presença de KR nos tratamentos com adição de extrato de microalgas mas não no tratamento controle, os resultados das plântulas mostraram a presença de ABA em todos os tratamentos, incluindo o controle. A quantificação desse composto mostrou que as plântulas do tratamento com 1,0 g L⁻¹ de extrato possuem menores teores de ABA em sua biomassa, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O controle e as concentrações 2,0 e 4,0 g L⁻¹ não diferem entre si, enquanto a maior concentração de ABA na biomassa

das plântulas foi observada para o tratamento com 0,5 g L⁻¹ de extrato de microalgas (Figura 49).

FIGURA 49 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO NAS PLÂNTULAS APÓS 120 DIAS DE TRANSPLANTIO EM MEIO COM EXTRATO



NOTA: Determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos realizada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tuckey ($p < 0,05$). Barras com letras iguais não diferem estatisticamente

Os dados apresentados na Figura 50 corroboram os demais dados de caracterização morfológica das plântulas obtidas após o cultivo de 120 dias, uma vez que o tratamento que apresentou melhores respostas de desenvolvimento de sistema foliar e radicular, bem como acúmulo de biomassa coincide com a menor concentração de ABA em seus tecidos, considerando que este regulador vegetal é reconhecido por suas funções relacionadas a inibição do desenvolvimento vegetal.

A correlação dos resultados obtidos nos ensaios com as orquídeas na etapa de germinação e na etapa de produção de plântulas, juntamente com os resultados de composição do extrato aquoso, permite discutir a ação dos componentes do extrato sobre o desenvolvimento das orquídeas *in vitro*. Ainda que os resultados obtidos possam ser atribuídos à presença de fitormônios no extrato aquoso, é importante destacar uma possível ação sinérgica entre os diferentes componentes do extrato. De qualquer maneira, os resultados da utilização do extrato da microalga na propagação da orquídea mostraram grande potencial de aplicação.

5 CONCLUSÃO

A propagação *in vitro* de plantas de orquídeas é uma ferramenta fundamental nas estratégias de recuperação de espécies ameaçadas de extinção e na produção de plantas para o mercado de flores sem ocasionar a sobre-exploração das espécies em seus ambientes de ocorrência natural. Com base na importância desse processo, a utilização do extrato aquoso da microalga *D. subspicatus* como aditivo ao meio de cultura de propagação apresenta elevado potencial biotecnológico, uma vez que os resultados obtidos nas etapas de germinação assimbiótica e produção de mudas foram muito promissores.

As respostas fisiológicas observadas indicam que a ação exógena dos compostos do extrato possui influência nos níveis endógenos de citocininas como a cinetina ribosídeo, o que acabou por favorecer as respostas de morfogênese nos protocormos. Da mesma forma, os níveis de ácido abscísico registrados nas plantas ao final de 120 dias de cultivo correlacionam-se com o desenvolvimento dos sistemas foliar e radicular observados.

REFERÊNCIAS

- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11347>>. Acesso em: 26 Set. 2018.
- BURCZYK, J.; Maria Zycha, IOANNIDIS, N.; E.; KOTZABASIS. K.; Polyamines in Cell Walls of Chlorococcalean Microalgae. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 69, p. 75–80, 2014.
- CAZZANIGA, S.; DALL'OSTO L.; SZAUB, J.; SCIBILIA, L.; BALLOTTARI, M.; PURTON, S.; BASSI, R. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-13, 2014.
- GROßKINSKY, D K.; ALBACETE, A.; JAMMER, A.; KRBEZ, P. VANDER GRAFF, E.; PFEIFHOFER, H.; ROITSCH, T. A Rapid Phytohormone and Phytoalexin Screening Method for Physiological Phenotyping. **Molecular Plant**, v. 7, p. 1053-1056, 2014.
- GUPTA, A. Studies on *Malaxis acuminata* d. don (= *Microstylis wallichii* lindl.) a medicinally important orchid. **Journal of Global Research Computer Science and Technology**, v. 4, p. 1-11, 2016.
- JORGE, J.; JURAS, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial in vitro de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista brasileira de biociências**, v. 13, p. 134-141, 2015
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, N. S.; FERREIRA, B. R. R.; MACHADO DE CARVALHO, E.; DAMIANI, C. R. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2347–2358, 2018.

PINTOS, B.; MARTÍN, J. P.; CENTENO, M. L.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTÍN, L. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 163, p. 955-960, 2002.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 57, p. 431-449, 2006.

SCHNEIDER, L.; ARAÚJO, J. S. P.; ZAFFARI, G. R. Seed Germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in Alternative culture Media. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 4, n. 7; p. 60-66, 2014.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cell, Dev, Biol, Plant**, 48, 500-511, 2012

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v. 58, p.1-14, 2017.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados referentes ao desenvolvimento do presente projeto foram divididos em 4 capítulos a fim de representar de maneira mais fiel as etapas de experimentação prática, iniciando com o desenvolvimento do sistema de cultivo que permitiu a produção de biomassa de microalgas em uma escala que fosse capaz de atender as demandas da tese e auxiliar o desenvolvimento de outros projetos no grupo de pesquisa. Como resultado objetivo dessa etapa foi realizado junto ao INPI o depósito do pedido de patente BR102016029485-1 (comprovante em anexo).

Na sequência cronológica das atividades foram apresentados os resultados do cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* no fotobiorreator desenvolvido e da recuperação da biomassa por floculação utilizando quitosana como agente floculante. Os resultados referentes a essa etapa foram compilados em um artigo científico publicado na revista *Journal of Applied Phycology*, volume 32, número 2, 2019 (comprovante em anexo).

No capítulo 3 foram apresentados resultados de composição química e atividade bioestimulante vegetal do extrato de *D. subspicatus* no desenvolvimento de plantas de alface em diferentes estádios de crescimento. Além da utilização do extrato “bruto” foram avaliados o fracionamento do extrato por adsorção em coluna de sílica e as atividades citocinínica e auxínica dessas frações.

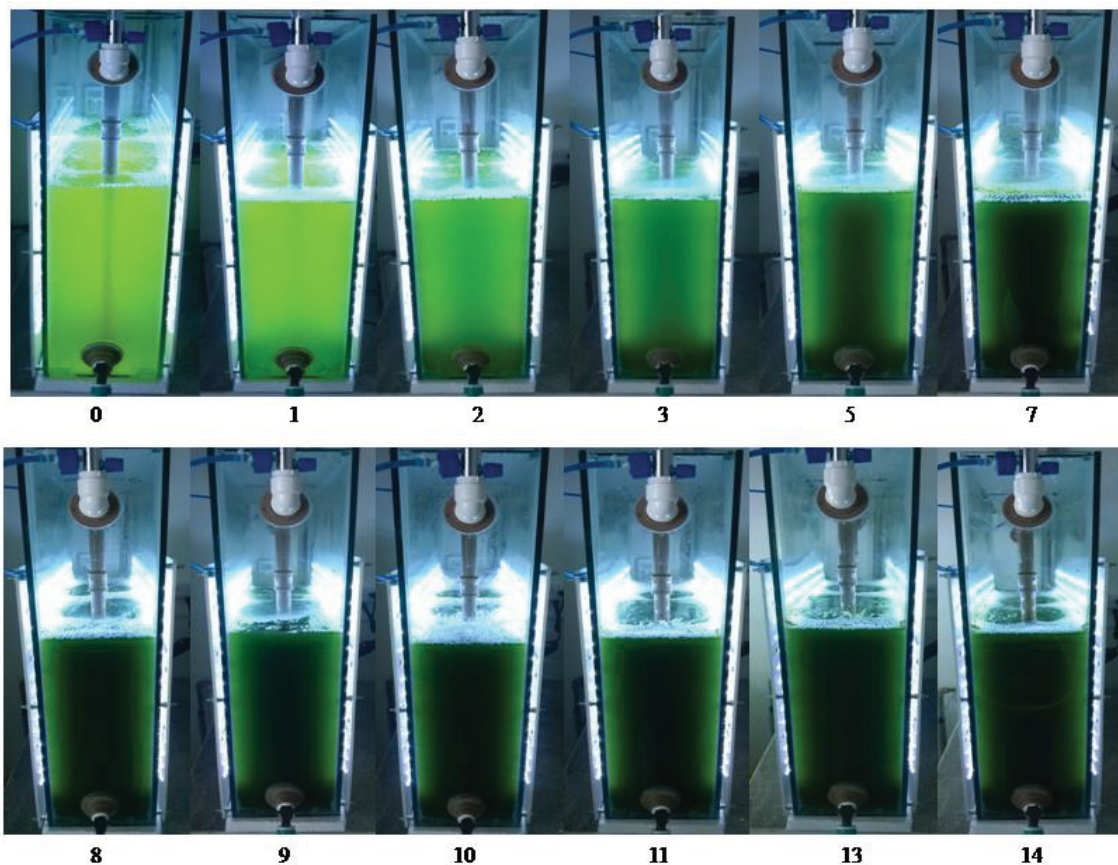
Por fim, o capítulo 4 apresentou resultados da utilização do extrato aquoso de *D. subspicatus* como aditivo no meio de cultura para propagação *in vitro* da orquídea *Cattleya warneri* através da germinação assimbiótica das sementes, seguida do crescimento e produção de plântulas em uma segunda etapa experimental. Os resultados dos capítulos 3 e 4 deverão ser estruturados na forma de publicações em revistas indexadas na área de biotecnologia.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda que tenham sido abordadas diferentes vertentes do processo de produção de biomassa de microalgas para a obtenção de compostos com atividade bioestimulante vegetal, é natural que restem diversos questionamentos sem que tenham sido respondidos. Sendo assim, algumas das possibilidades a serem abordados por trabalhos futuros incluem:

- Avaliação de metodologias alternativas para o fracionamento do extrato aquoso com o objetivo de obter frações mais puras para serem isolados e investigados os compostos com maior potencial de atividade bioestimulante;
- Avaliação do extrato aquoso em metodologias diversas de micropropagação de plantas, a fim de descobrir novos usos potenciais na biotecnologia vegetal;
- Otimização das metodologias de extração e caracterização dos compostos presentes no extrato, especialmente aminoácidos e fitormônios;
- Determinação da resposta fisiológica dos modelos vegetais frente a aplicação do extrato aquoso, através da quantificação dos teores de fotoassimilados, proteínas, aminoácidos, poliaminas e fitormônios;
 - Escalonamento da avaliação da atividade bioestimulante através da realização de experimentos no campo, a fim de emular de maneira mais realista as respostas dos vegetais durante as aplicações do extrato aquoso da microalga.

APÊNDICE 1 - CULTIVO DA MICROALGA DURANTE 14 DIAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA



ASPECTO VISUAL DA PROGRESSÃO DOS CULTIVOS DE *Desmodesmus subspicatus* EM FOTOBIOREATOR DE PLACA PLANA DURANTE 14 DIAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

ANEXO 1 - FORMULÁRIO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

< Uso exclusivo do INPI >



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

15/12/2016 015160000657
15 38 DEPR



BR 10 2016 029485 1

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: <div style="text-align: center;">Formulário</div>	DIRPA	Página: <div style="text-align: center;">1/3</div>
Título do Documento: <div style="text-align: center;">Depósito de Pedido de Patente</div>		Código: <div style="text-align: center;">FQ001</div>	Versão: <div style="text-align: center;">2</div>
		Procedimento: <div style="text-align: center;">DIRPA-PQ006</div>	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná
- 1.2 Qualificação: Autarquia Federal
- 1.3 CNPJ/CPF: 75095679/0001-49
- 1.4 Endereço Completo: Rua João Negrão, 280 2º andar Curitiba/PR
- 1.5 CEP: 80010-200
- 1.6 Telefone: 41-33607441 1.7 Fax: 41-33607416
- 1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

☐ continua em folha anexa

- 2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

FOTOBIOREATOR PARA CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

☐ continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa





INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		2/3
	Depósito de Pedido de Patente		
	Código:	Versão:	
	FQ001	2	
	Procedimento:		
	DIRPA-PQ006		

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Miguel Daniel Nosedá

6.2 Qualificação: Professor Doutor

6.3 CPF: 003.621.459-03

6.4 Endereço Completo: Av. Cel. Francisco H dos Santos, 210, Curitiba/PR

6.5 CEP: 81531-980

6.6 Telefone: (41) 3361-1576

6.7 FAX:

6.8 E-mail: mdn@ufpr.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.



Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

☐ continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



Jef.


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	02
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	14
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	02
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n°, <u>01</u> por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	04
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: ____ n° de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) DOU e Anexo Continuação Formulário FQ001 (Inventores)	03

12. Total de folhas anexadas: 26 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Curitiba, 14 de dezembro de 2016

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. ZAKIAKEL SOBRINHO
Reitor *

ANEXO DE CONTINUAÇÃO – FORMULÁRIO FQ001

2. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Diego de Oliveira Corrêa

CPF: 061344239-39

Qualificação: Mestre

Endereço: Av. Cel. Francisco H dos Santos, 210 – Jardim das Américas – Curitiba – Paraná

Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e

Biologia Molecular.

CEP: 81531-980

Telefone: (41) 3361-1579

E-mail: diego.biodoc@gmail.com

3. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Maria Eugênia Duarte Nosedá

CPF: 320877059-68

Qualificação: Professora Doutora

Endereço: Av. Cel. Francisco H dos Santos, 210 – Jardim das Américas – Curitiba – Paraná

Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e

Biologia Molecular.

CEP: 81531-980

Telefone: (41) 3361-1576

E-mail: nosedaue@ufpr.br

4. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Amanda Cristina de Oliveira

CPF: 053621639-81

Qualificação: Mestre

Endereço: Av. Cel. Francisco H dos Santos, 210 – Jardim das Américas – Curitiba – Paraná

Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e

Biologia Molecular.

CEP: 81531-980

Telefone: (41) 3361-1579

E-mail: amandacrisliveira@gmail.com

5. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Bianka Sanae Noda Dominiz



CPF: 057619479-43

Qualificação: Acadêmica do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Endereço: Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR, Brasil

CEP: 81531-980

Telefone: (41) 3361-1579

E-mail: dominiz.bianka@gmail.com

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item I.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Jenifer Mota Rodrigues

CPF: 059484919-51

Qualificação: Doutora

Endereço: Av. Cel. Francisco H dos Santos, 210 – Jardim das Américas – Curitiba – Paraná
Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular.


CEP: 81530-980




Telefone: (41) 3361-1579


E-mail: jeni.mota.r@gmail.com



ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO ARTIGO PUBLICADO

 Springer

  Diego de Oliveira Correa  Global Website



[Home](#) [Subjects](#) [Services](#) [Springer Shop](#) [About us](#)

Open Access

- » [SpringerOpen](#)
- » [Open Choice](#)
- » [Agreements](#)
- » [BioMed Central](#)
- » [Open access funding](#)
- » [Authors' rights](#)
 - [Self-archiving policy](#)
 - [FAQ](#)
 - [Funder compliance](#)
- » [Open access track record](#)
- » [Contact us](#)

Self-archiving policy

We are a 'green' publisher, as we allow self-archiving, but most importantly we are fully transparent about your rights.

▼ Self-archiving for articles in subscription-based journals

By signing the Copyright Transfer Statement you still retain substantial rights, such as self-archiving:

Author(s) are permitted to self-archive a pre-print and an author's accepted manuscript version of their Article.

a. a pre-print is the author's version of the Article before peer-review has taken place ("Pre-Print"). Prior to acceptance for publication, Author(s) retain the right to make a Pre-Print of their Article available on any of the following: their own personal, self-maintained website; a legally compliant, non-commercial pre-print server such as but not limited to arXiv and bioRxiv. Once the Article has been published, the Author(s) should update the acknowledgement and provide a link to the definitive version on the publisher's website: "This is a pre-print of an article published in [insert journal title]. The final authenticated version is available online at: [https://doi.org/\[insert DOI\]](https://doi.org/[insert DOI])".

b. An Author's Accepted Manuscript (AAM) is the version accepted for publication in a journal following peer review but prior to copyediting and typesetting that can be made available under the following conditions:

a. Author(s) retain the right to make an AAM of their Article available on their own personal, self-maintained website immediately on acceptance,

b. Author(s) retain the right to make an AAM of their Article available for public release on any of the following 12 months after first publication ("Embargo Period"): their employer's internal website; their institutional and/or funder repositories. AAMs may also be deposited in such repositories immediately on acceptance, provided that they are not made publicly available until after the Embargo Period.

An acknowledgement in the following form should be included, together with a link to the published version on the publisher's website: "This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in [insert journal title]. The final authenticated version is available online at: [http://dx.doi.org/\[insert DOI\]](http://dx.doi.org/[insert DOI])".

When publishing an article in a subscription journal, without open access, authors sign the Copyright Transfer Statement (CTS) which also details Springer's self-archiving policy.

See [here](#) for Springer Nature terms of reuse for archived author accepted manuscripts (AAMs) of subscription articles.

Publishing open access

If you publish your article open access, the final published version can be archived in institutional or funder repositories and can be made publicly accessible immediately.

» [Open Access at Springer](#)

► Self-archiving for non-open access books and chapters